

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

OMAR DANIEL PAIRAZAMÁN QUIROZ

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA A UTILIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS
HEMICELULÓSICOS DOS CACHOS VAZIOS DA PALMA (*Elaeis guineensis*) NA
PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS.

CURITIBA

2017

OMAR DANIEL PAIRAZAMÁN QUIROZ

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA A UTILIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS
HEMICELULÓSICOS DOS CACHOS VAZIOS DA PALMA (*Elaeis guineensis*) NA
PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obter o grau de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adenise Lorenci Woiciechowski.

Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol.

CURITIBA

2017

OMAR DANIEL PAIRAZAMÁN QUIROZ

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

P148p

Pairazamán Quiroz, Omar Daniel

Potencial biotecnológico para a utilização dos hidrolisados hemicelulósicos dos cachos vazios da palma (*Elaeis guineensis*) na produção de ácidos orgânicos [recurso eletrônico] / Omar Daniel Pairazamán Quiroz. – Curitiba, 2017.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2017.

Orientador: Adenise Lorenci Woiciechowski – Coorientador: Carlos Ricardo Soccol .

1. Ácidos orgânicos. 2. *Elaeis guineensis*. 3. Palma. 4. Hidrólise. 5. Ácido fumárico. 6. Ácido láctico. I. Universidade Federal do Paraná. II. Woiciechowski, Adenise Lorenci. III. Soccol , Carlos Ricardo. IV. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor: TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA
Código CAPES: 40001016036P8


TERMO DE APROVAÇÃO

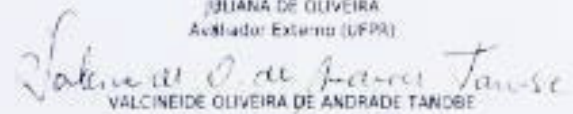
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **OMAR DANIEL PAIRAZAMAN QUIROZ**, intitulada: **"Potencial Biotecnológico para a utilização dos hidrolisados hemicelulósicos dos cachos vazios de palme (*Elaeis guineensis*) na produção de ácidos orgânicos."** após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação

Curitiba, 23 de Março de 2017.

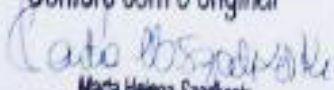

ADENIS LORENI WDZECIOWSKI
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ARION ZANDONÁ FILHO
Avaliador Externo (UFPR)


JULIANA DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UFPR)


VALCINEIDE OLIVEIRA DE ANDRADE TANDE
Avaliador Externo (UFPR)

Confere com o original


Marta Helena Szadkowski
Secretária Executiva do PPGE/BBTC/UFPR
Memorial: 205354

Para minha mãe Doris Quiroz, pilar indiscutível de minha fortaleza, exemplo de perseverança e coragem.

Agradecimentos

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e ao grupo Coimbra de universidades Brasileiras pela oportunidade e o apoio financeiro.

Ao professor Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela oportunidade de pesquisar no laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Agradeço também à minha orientadora, prof.^a Dr.^a. Adenise, pela oportunidade de trabalhar no sua equipe, pela orientação e amizade durante meu estágio no Brasil.

Ao professor Arión Zandona Filho, pelo apoio incondicional e pela amizade.

À os professores do colegiado do programa, pela disposição e apoio.

A Luis Perez, pela grande amizade, companheirismo durante minha permanência no Brasil.

A Mara, Marcela, Brenda, Cristina e Renato pela paciência, força e compreensão nos meus momentos de estresse.

Aos amigos e colegas de laboratório, Lina, Biaani, Estefania, Emerson, Joyce, Priscila, Erikson, Carolina, Zulma, Patrick, Lorenzo, Débora, Juliana, Otacílio, Liliana, Lucas, Nelson, André, Ana, Mauricio, Marcela, António, Mariza, Jhonathan, Luis Z, Kim, Grécia, Denise, Walter, Fernanda K, Fernanda P, Daniel, Sayuri, Bruna, Driely, Dão, Mitiyo e Natasha, pela amizade e parceria.

Enquanto dispuser de tempo, nesta terra, dirija seus passos pela senda do bem. Procure agir, fazer sempre alguma coisa em benefício de alguém, embora seja apenas uma palavra de conforto, um gesto de carinho, um sorriso de incentivo. Faça alguma coisa em favor do próximo, e terá o coração cheio de alegria e de felicidade (Anônimo).

RESUMO

Os cachos vazios dos frutos da palma (EFB) são uma biomassa vegetal, com elevada concentração de polissacarídeos. A celulose constitui a maior fração entre 30 a 40%, seguida da hemicelulose entre 20 a 25% e a lignina entre 20 a 35%. Por outro lado os microrganismos do gênero *Rhizopus* se caracterizam pela habilidade de assimilar hexoses e pentoses, além de ser resistentes a inibidores. Obtiveram-se açúcares a partir da fração compreendida entre 0,35-0,42 mm de diâmetro de partícula dos EFB quando foi exposta a um tratamento ácido usando 1,5% de H₂SO₄ em uma relação 1:10 (w/v) e a um tratamento térmico a 130°C por 15 minutos obtendo uma concentração de açúcares totais de 23,32 g.L⁻¹ tendo a xilose 19,82 g.L⁻¹. O hidrolisado neutralizado com NaOH (4M), filtrado e sem processo de detoxificação, serviu de meio de cultivo, em um teste inicial, para avaliar o crescimento *Rhizopus delemar* 34612 e *Rhizopus oryzae* 28168 detectando a produção de ácido fumárico em torno de 1,5 g.L⁻¹ usando peptona de soja. Posteriormente avaliou-se o comportamento de 17 cepas de *Rhizopus* através de fermentação submersa, onde *Rhizopus circicans* 1745, apresentaram maiores produções de ácido fumárico 2,25±1,51 g.L⁻¹. Com o aumento da concentração de xilose no hidrolisado até 32,75 g.L⁻¹, chegou-se a determinar que *R. circicans* 1475 e *R. 3271* produzem 5,67±0,27 e 5,25±0,82 g.L⁻¹ de ácido fumárico. *R. circicans* 1475 produziu 3,99±0,80 g.L⁻¹ de ácido láctico. A melhor forma da biomassa para a produção de ácido fumárico é o pellet. Em conclusão, os açúcares da fração hemicelulolítica dos cachos vazios da palma, podem ser utilizados por *Rhizopus* para a produção de ácido fumárico e ácido láctico.

Palavras-chave: Cachos vazios da palma, hidrólises ácida, *Rhizopus*, ácido fumárico e ácido láctico, pellet

ABSTRACT

The Empty fruit bunches (EFB) are plant biomass with a high concentration of polysaccharides. Cellulose constitutes the largest fraction between 30 to 40%. Therefore, it could be said that half of the weight of EFB is constituted by sugars. On the other hand, the microorganisms of the genus *Rhizopus* are characterized by the ability to assimilate hexoses and pentoses, besides being resistant to inhibitors. The 0,35-0,42 mm fraction of the EFB was exposed to acid treatment using 1,5% H₂SO₄ in a 1:10 (w/v) solid-liquid ratio at 130 °C for 15 minutes, obtaining a sugar concentration of 23,32 g.L⁻¹ and xylose concentration of 19,82 g.L⁻¹. The hydrolyzate neutralized with NaOH (4M), filtered and without detoxification process, served as culture medium in an initial test to evaluate the growth *Rhizopus delemar* 34612 and *Rhizopus oryzae* 28168, detecting the production of fumaric acid around 1,5 g.L⁻¹ using soy peptone. Subsequently, the behavior of 17 strains of *Rhizopus* was evaluated through submerged fermentation, where *Rhizopus circicans* 1745 presented the highest yields for fumaric acid of 2,25 ± 1,51 g.L⁻¹. As the concentration of xylose in the hydrolyzate increased to 32,75 g.L⁻¹, it was determined that *R. circicans* 1475 and *R. 3271* produced 5,67 ± 0,27 and 5,25 ± 0,82 g.L⁻¹ of fumaric acid, respectively. Also, *R. circicans* 1475 produced 3,99 ± 0,80 g.L⁻¹ lactic acid. The best form of the cellular biomass for the production of fumaric acid is as pellet. In conclusion, sugar from the hemicellulolytic fraction of the empty palm bunches can be used by *Rhizopus* for the production of fumaric acid and lactic acid.

Keywords: Empty Fruit Bunches, Hydrolysed acid, *Rhizopus*, fumaric acid, lactic acid, pellet

Lista de Tabelas

	Pág.
Tabela 1-1 Produção de ácido fumárico a partir da glicose usando espécies de <i>Ryzopus</i> sp.....	31
Tabela 1-2 Produção de ácido fumárico a partir de xilose e resíduos vegetais usando <i>Ryzopus</i> sp., considerando o tamanho do pellet no pre-cultivo.....	32
Tabela 1-3 Bactérias mesófilas e termófilas identificadas nas pilas de compostagem dos EFB.....	43
Tabela 1-4 Actinomicetes identificados nas pilas de compostagem os EFB e enzimas produzidas.....	43
Tabela 2-1 Tempos de retenção no HPLC.....	65
Tabela 2-2 Recuperação das pentoses da hemicelulose da biomassa dos EFB na hidrólise.....	67
Tabela 2-3 Análise de sinais do hidrolisado no detector UV a 208nm.....	70
Tabela 3-1 Meios de cultivo contendo o hidrolisado dos cachos vazios da palma com três fontes de nitrogênio diferentes.....	74
Tabela 3-2 Contagem de esporos de <i>R. delemar</i> 34612 e <i>R. oryzae</i> 28618.....	76
Tabela 3-3 Características morfológicas dos fungos avaliados.....	78
Tabela 3-4 Consumo dos açúcares e do ácido acético após da fermentação de <i>R. delemar</i> 34612, a 30°C, 120 rpm, 96 horas, usando 6.0 g.L ⁻¹ de peptona de soja.....	83
Tabela 3-5 Consumo dos açúcares e do ácido acético após da fermentação de <i>R. delemar</i> 34612, a 30°C, 120 rpm, 96 horas, usando 6.0 g.L ⁻¹ de peptona de soja.....	84
Tabela 3-6 Valores das áreas para cada concentração de ácido málico.....	87
Tabela 3-7 Valores das áreas para cada concentração de ácido láctico.....	88
Tabela 3-8 Valores das áreas para cada concentração de ácido fumárico.....	89
Tabela 4-1 Cepas de <i>Rhizopus</i> pertencentes à coleção do banco de linhagens do laboratório de processos biotecnológicos (LPB) da Universidade Federal do Paraná.....	96
Tabela 4-2 Composição dos meios de fermentação na segunda avaliação.....	97
Tabela 4-3 Determinação da biomassa e produção de ácidos orgânicos usando peptona de soja (6 g.L ⁻¹).....	105
Tabela 4-4 Determinação da biomassa e produção de ácidos orgânicos usando sulfato de amônia (1.5 g.L ⁻¹).....	107
Tabela 4-5 Análise de variância das cepas de <i>Rhizopus</i>	121
Tabela 4-6 Análise de variância das cepas de <i>Rhizopus</i>	122
Tabela 4-7 Teste de Tukey das cepas de <i>Rhizopus</i>	123

Tabela 4-8	Parâmetros de medição das fermentações por Rhizopus no hidrolisado dos cachos vazios do fruto da palma, usando peptona de soja.....	128
Tabela 4-9	Parâmetros de medição das fermentações por Rhizopus, usando sulfato de amônio.....	129

Lista de Figuras

		Pág
Figura 1-1	Produção de biodiesel B100, no Brasil 2005-2017 (m ³).....	16
Figura 1-2	Produção de ácido fumárico na historia. Fonte (Autor).....	18
Figura 1-3	Concentração de países produtores e exportadores de óleo cru de palma em 2015. Fonte: www.trademap.org.....	22
Figura 1-4	Biomassa obtida da palma.....	23
Figura 1-5	Rota metabólica usada por <i>Rhizopus oryzae</i> para a obtenção de ácido fumárico, ácido láctico e etanol, modificada de Zhang et al. (2012) e de Wang et al.(2015). Onde PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilase), PC (Piruvato carboxilase), PD (Piruvato desidrogenase), MD (Malato deidrogenase), F (Fumarasa). Fonte (AUTOR).....	28
Figura 1-6	Subprodutos obtidos a partir das hidrolises ácidas dos EFB. Fonte (AUTOR).....	34
Figura 1-7	Regiões do pellet fúngico e sua gradiente de oxigênio na fermentação submersa.....	35
Figura 1-8	Filamento do crescimento fúngico em cultivos submersos.....	36
Figura 1-9	Técnicas de melhoramento genético baseado na sobre-expressão de enzimas e proteínas melhorar a produção de ácido fumárico. Fonte (AUTOR).....	40
Figura 1-10	Subprodutos obtidos em processos microbiológicos e biotecnológicos a partir dos resíduos da extração de óleo de palma. Fonte (AUTOR)....	41
Figura 2-1	Comparação dos componentes do hidrolisado dos EFB.....	63
Figura 2-2	Moléculas detectadas no espectro de luz ultravioleta (UV) com um comprimento de onda de 208nm.....	64
Figura 2-3	Análise de varredura de uma amostra do hidrolisado no espectro UV-VIS no comprimento de onda de 200 até 900nm.....	66
Figura 3-1	A: Cromatograma dos padrões de açúcares e ácidos orgânicos, usando o detector de índice de refração com concentrações de 1 e 2 g.L ⁻¹ . B: Cromatograma de ácido fumárico a 1 g.L ⁻¹ usando o índice de luz UV.....	75
Figura 3-2	Cromatogramas ao termino da fermentação. A: <i>R. delemar</i> 34612 eB: <i>R. oryzae</i> 28168 com sulfato de amônia(1.5g/L).....	79
Figura 3-3	Cromatogramas ao termino da fermentação. A: <i>R. delemar</i> 34612 eB: <i>R. oryzae</i> 28168 com peptona de soja (6.0/L).....	79

Figura 3-4	Biomassa de <i>R. delemar</i> 34614 formadas nos meios hidrolisados da palma com CaCO ₃ e peptona de soja a 6g/L e 14 g/L, à 120 rpm, 30°C, por 172h.....	80
Figura 3-5	Biomassa de <i>R. delemar</i> 34614 após da fermentação com o hidrolisado dos EFB e peptona de soja a 6 e 14g/L, a 30°C, 120RPM por 96 horas.....	81
Figura 3-6	Biomassa de <i>R. delemar</i> 34614 formadas nos meios hidrolisados da palma com CaCO ₃ e peptona de soja a 6g/L e 14 g/L, à 120 rpm, 30°C, por 172h.....	82
Figura 3-7	Curva padrão para ácido málico.....	87
Figura 3-8	Curva padrão para ácido láctico.....	88
Figura 3-9	Curva padrão para ácido fumárico.....	89
Figura 3-10	Morfologia de <i>R. oryzae</i> 28628 e <i>R. delemar</i> 34612 (6g/L de peptona de soja) no final da fermentação.....	90
Figura 3-11	Morfologia dos fungos no meio com sulfato de amônia (1.5%) no final da fermentação.....	91
Figura 3-12	Sinais que são consumidas ou transformadas no processo de fermentação	92
Figura 4-1	Concentração de esporos das 17 espécies de Rhizopus no meio arroz e o tempo de incubação.....	99
Figura 4-2	Produção de ácido fumárico e sua correlação com a biomassa seca e a quantidade de esporos utilizada na fermentação.	101
Figura 4-3	Morfologias das biomassas dos Rhizopus avaliados.....	103
Figura 4-4	Produção de ácido fumárico e consumo de açúcares usando peptona de soja.....	106
Figura 4-5	Produção de ácido fumárico e consumo de açúcares, usando sulfato de amônia.....	109
Figura 4-6	Determinação da biomassa seca das espécies de Rhizopus usando hidrolisado dos cachos vazios da palma com diferentes fontes nitrogenadas.....	111
Figura 4-7	Produção de ácidos orgânicos usando peptona de soja. A: <i>R. circicans</i> 1475. B: <i>R. 395</i> . C: <i>R. 3275</i>	112
Figura 4-8	Produção de ácidos orgânicos usando sulfato de amônia. A: <i>R. circicans</i> 1475. B: <i>R. 395</i> . C: <i>R. 3275</i>	116
Figura 4-9	Morfologias da biomassa dos seis fungos avaliados na primeira seleção usando peptona de soja.	124
Figura 4-10	Morfologias da biomassa dos seis fungos avaliados na primeira seleção usando sulfato de amônio.	125

Figura 4-11	Morfologias da biomassa dos três fungos avaliados na segunda seleção usando peptona de soja.....	126
Figura 4-12	Morfologias da biomassa dos três fungos avaliados na segunda seleção usando sulfato de amônio.....	127

SUMÁRIO

	Pag.
1. Introdução	16
Revisão bibliográfica.....	20
1.1. Palma.....	20
1.1.1. Historia da palma no Brasil.....	20
1.1.2. Características e ciclo de vida da palma.....	20
1.1.3. Importância do óleo da palma nos biocombustíveis.....	21
1.1.4. Mercado Mundial da Palma.....	21
1.1.5. Resíduos da palma.....	23
1.1.6. Cachos vazios do fruto da palma.....	23
1.1.7. Características dos EFB.....	24
1.1.8. Aproveitamento dos EFB.....	25
1.2. Rhizopus.....	25
1.2.1. Classificação e importância biotecnológica de Rhizopus.....	25
1.2.2. Potencial de Rhizopus na produção de ácidos orgânicos.....	26
1.2.3. Biossíntese de ácido fumárico por Rhizopus.....	27
1.3. Produção biotecnológica de ácido fumárico.....	28
1.3.1. Ácido fumárico.....	28
1.3.2. Produção de ácido fumárico usando resíduos vegetais.....	29
1.3.3. Inibidores da fermentação.....	30
1.3.4. Requerimentos nutricionais e fatores relevantes na produção de ácido fumárico.....	35
1.3.4.1. Separação do processo fermentativo: Desenvolvimento do inóculo.....	35
1.3.4.1.1. Meio semente.....	35
1.3.4.1.2. Meio de fermentação.....	36
1.3.5. Produção de ácido fumárico usando outras tecnologias.....	37
1.3.5.1. Uso de Biorreatores e células imobilizadas.....	37
1.3.5.2. Sacarificação em simultâneo (SSF).....	37

1.3.5.3.	Otimização do meio de fermentação.....	38
1.3.5.4.	Melhoramento genético.....	38
1.4.	Potencial biotecnológico dos resíduos do processamento dos frutos da palma.....	40
1.4.1.	Subprodutos obtidos a partir da biomassa vegetal.....	41
1.4.1.1.	Compostagem.....	41
1.4.1.2	Biohidrogênio.....	44
1.4.1.3.	Biogás.....	45
1.4. 2.	Considerações finais.....	46
1.5.	Referências.....	47
2.	Caracterização do hidrolisado dos cachos vazios da palma (EFB).	59
	Resumo.....	59
2.1.	Introdução.....	59
2.2.	Material e metodologia.....	61
2.2.1.	Biomassa vegetal.....	61
2.2.2.	Hidrólise ácida.....	61
2.2.3.	Análise do hidrolisado por espectroscopia no ultravioleta visível.....	61
2.2.4.	Determinação de açúcares e subprodutos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	62
2.3.	Resultados e discussão.....	62
2.3.1.	Espectro UV-VIS do hidrolisado.....	62
2.3.2.	Açúcares contidos no hidrolisado.....	63
2.4.	Conclusões.....	66
2.5.	Referências.....	67
	Anexo.....	70
3.	Potencial do hidrolisado dos cachos vazios de <i>Elaeis guineensis</i> na produção de ácido fumárico, usando <i>Rhizopus</i>.....	71
	Resumo.....	71
3.1.	Introdução.....	71
3.2.	Material e metodologia.....	73
3.2.2.	Biomassa vegetal.....	73
3.2.3.	Produção de esporos	73
3.2.4.	Meios de fermentação.....	74

3.2.5.	Medição da biomassa.....	74
3.2.6.	Determinação de açúcares e subprodutos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	75
3.3.	Resultados e discussão	75
3.3.1.	Produção de esporos.....	75
3.3.2.	Avaliação da produção de ácidos orgânicos, usando os açúcares contidos no hidrolisado dos cachos vazios da palma.....	76
3.3.3.	Efeito da peptona de soja na produção de ácidos orgânicos.....	80
3.4.	Conclusões.....	84
3.5	Referências.....	85
	Anexo.....	87
4.	Seleção de Rhizopus produtores de ácido fumárico.....	93
4.1.	Introdução.....	93
4.2.	Materiais e métodos.....	95
4.2.1.	Biomassa vegetal.....	95
4.2.2.	Hidrólise ácida.....	95
4.2.3	Produção de esporos.....	95
4.2.4.	Meio de fermentação para primeira seleção de Rhizopus produtores de ácido fumárico.....	96
4.2.5	Meio de fermentação para a segunda seleção de Rhizopus.....	97
4.2.6.	Medição da biomassa.....	97
4.2.7.	Determinação de açúcares e subprodutos por cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC).....	98
4.3	Resultados e discussão.....	98
4.3.1	Produção de esporos.....	98
4.3.2.	Produção de ácido fumárico: primeira seleção.....	99
4.3.4.	Análise da biomassa formada.....	100
4.3.5.	Produção de ácido fumárico: segunda seleção.....	105
4.3.6.	Produção de ácido fumárico usando três cepas de Rhizopus.....	111
4.4.	Conclusões.....	118
4.5	Referências.....	119
	Anexo.....	121

1. INTRODUÇÃO

A produção de biodiesel no Brasil tem se incrementado oito vezes nos últimos 11 anos, com projeções de seguir aumentando (Figura 1-1). A partir de 2016, o Brasil se encaminha a incrementar sua produção de biodiesel, com o afã de substituir o diesel derivado do petróleo por aquele obtido do óleo de palma (ABIOVE, 2013). As elevadas concentrações de carotenóides presentes no óleo ressaltam a sua boa qualidade, evitando a auto-oxidação e a oxidação física dos ácidos graxos insaturados (FONTANA, 2011). Embora, após do processo de extração de óleo da palma, são produzidos resíduos que podem ser importantes biotecnologicamente, pela quantidade de açúcares e moléculas ativas, estes resíduos são os cachos vazios da palma (Empty Fruit Bunches, EFB), fibra prensada da palma (Fiber Pressed Palm, FPP) e os efluentes líquidos obtidos após da extração do óleo da palma (Palm Oil Mill Effluent, POME).

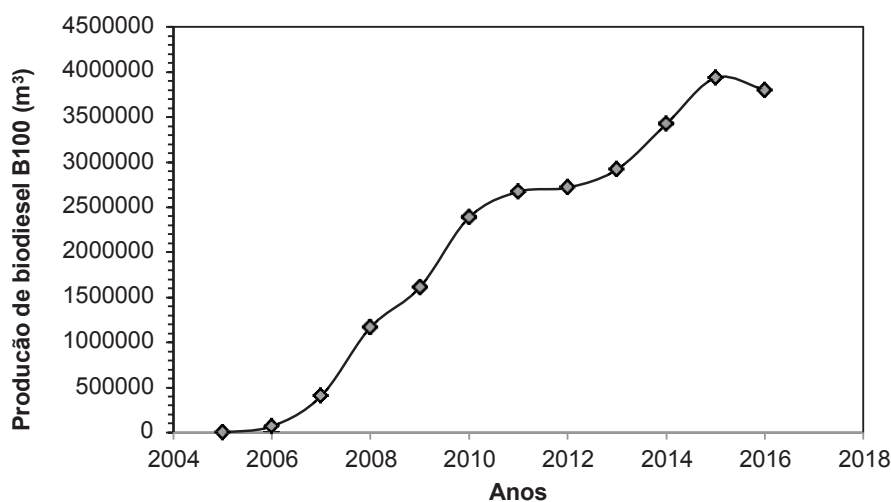


Figura 1-1. Produção de biodiesel - B100 (m³), por produtor 2005-2017. FONTE ANP.

<http://www.anp.gov.br/wwwanp/dados-estatisticos>

Atualmente, estes resíduos são utilizados em compostagem para a fabricação de biofertilizantes (ZAINUDIN et al., 2013), produção de biogás (Nurliyana et al., 2015), e inicialmente avaliações para a obtenção de biohidrogênio (HNIMAN et al., 2011). Os EFB são atrativos pela quantidade de açúcares (50-60%) e lignina (30-35%) contidos em sua estrutura. Por isso pesquisas baseadas na separação desses componentes

vêm-se desenvolvendo, aperfeiçoando estes processos (TAN et al., 2013; YING et al., 2014). Objetivando em consolidar uma biorrefinaria a partir dos EFB, pre-tratamentos são feitos para liberar as frações de celulose, hemicelulose e lignina (TAN et al., 2013; MEDINA et al., 2016).

Devido a que os EFB apresentam alta concentração de hemicelulose (20-25%), composta basicamente por xilose e arabinose (SHINOJ et al., 2011), a fração dos monossacarídeos é solubilizada pelas hidrolises ácidas (YING et al., 2014). Microrganismos como as leveduras, bactérias e fungos são testados para a síntese de produtos com valor agregado. Os fungos do filo zygomycota, são destacados como importantes atores dentro da biorrefinaria, pela capacidade de biossintetizar enzimas, etanol, ácidos orgânicos (FERREIRA et al., 2013).

Fungos do gênero *Rhizopus*, são destacados pela capacidade de acumular ácido fumárico no citosol, que é a parte do citoplasma com menor densidade de proteínas e organelas intracelulares e onde acontecem as reações metabólicas. Esta característica importante de *Rhizopus* ressalta de outros microrganismos que produzem o ácido fumárico exclusivamente no ciclo de Krebs, oferecendo novos enfoques biotecnológicos, baseados na estimulação de vias metabólicas para a produção de ácido fumárico. A primeira vez que se detectou ácido fumárico em um fungo foi em *Rhizopus nigricans* (ERLICH, 1911). A partir desse momento boas quantidades de pesquisas foram feitas (Figura 1-2), por exemplo, se descobriu as enzimas fundamentais no seu metabolismo, “piruvato carboxilase”, “fosfoenolpiruvato carboxilase”, “malato desidrogenase” e “fumarase”, conheceu-se o seu comportamento com diferentes tipos de açúcares que foram melhorados pelos processos de otimização com biorreatores, chegando até o melhoramento genético das espécies de *Rhizopus* hiper-produtoras e a recombinação de genes heterólogos com outras espécies de microrganismos como bactérias e leveduras (ZHANG et al., 2012; CHEN et al., 2015; SON et al., 2015).

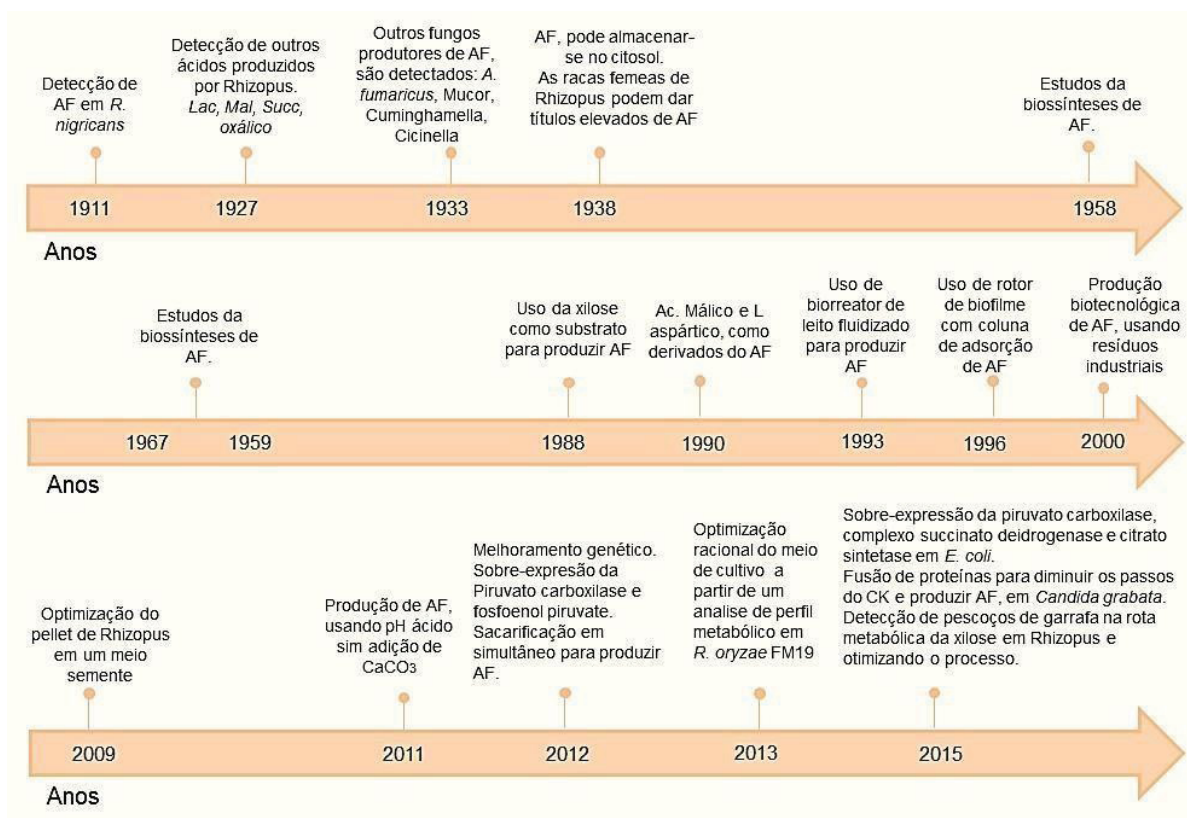


Figura 1-2. Produção de ácido fumárico na historia. Fonte (AUTOR).

O ácido fumárico quimicamente pode ser definido como um ácido dicarboxílico de quatro carbonos com uma dupla ligação (ZHOU et al., 2011). Possui características de aplicações importantes como: conservação dos alimentos frente ao ataque dos microrganismos na indústria dos alimentos, ser o precursor de moléculas de maior tamanho como as resinas de papel, alquiladas ou de poliéster, é sinalado como um das principais moléculas que servem nos blocos de construção de biopolímeros (ROA ENGEL et al., 2008).

Nesta revisão focou-se o potencial que tem os açúcares contidos nos EFB como substrato para *Rhizopus*, um fungo filamentoso com capacidades únicas no mundo microbiano e ressaltar a capacidade de produzir ácido fumárico de modo sustentável e amigável ao meio ambiente.

Objetivo general.

- ✓ Determinar o potencial produtor de ácidos orgânicos por *Rhizopus*, usando os hidrolisados dos cachos vazios da palma.

Objetivos específicos.

- ✓ Conhecer a composição de açúcares no hidrolisado ácido da fração compreendida entre 0,35 – 0,42 mm de diâmetro dos cachos vazios da palma.
- ✓ Selecionar a melhor cepa produtora de ácido fumárico.
- ✓ Determinar o efeito da morfologia de *Rhizopus* na produção de ácido fumárico.
- ✓ Determinar as melhores condições de cultivo de *Rhizopus*, na produção de ácido fumárico.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Palma

1.1.1. Historia da palma no Brasil

No final do século XVI, com a chegada dos imigrantes africanos, a palma "*Elaeis guineensis*" foi inserida nos campos de cultivo no nordeste do país, especificamente no Bahia (VENTURIERI et al., 2009). Nos últimos vinte anos fizeram-se esforços por melhorar a produção de óleo de palma, e para isso, em 2010, foram criadas: a "câmara setorial de óleo" e a "Abrapalma" que reúne os maiores produtores nacionais da palma do Brasil. Nesse contexto foi proposto o "Programa de produção Sustentável de Óleo de Palma no Brasil", onde foram destinados 60 milhões de reais para o melhoramento genético da palma, ampliar a oferta de sementes e mudas com uma genética definida para o Brasil, expandir a infraestrutura moderna para a produção de plantas matrizes, fomentar parcerias com institutos de excelência em óleo de palma e fomentar a pesquisa para avaliar os efeitos da espécie de palma (DROUVOT, 2012).

Um passo importante e significativo para lograr políticas de ampliação dos cultivos da palma foi dado em 2012, quando foi criada uma Lei que regula os cultivos da floresta amazônica "ZEE (50/50)", definindo que a metade (50%) do território amazônico poderia ser plantada com palma, preservando os outros 50% (RAMALHO, 2010). Em 2013 determinou-se que existem mais de 28.9 milhões de hectares propícios para os cultivos de palma, localizados principalmente no estado do Pará. Como referência em 2013 a área plantada foi de 180 mil hectares (FEROLDI et al., 2014). Novas estratégias estão sendo implementadas, para melhorar a produção de palma, uma delas é aumentar o tempo de vida produtivo até 40 anos de vida, conseguindo aproveitar mais o recurso vegetal. A "Vale do Rio Doce" com o projeto de Biopalma iniciou a produção de biodiesel usando óleo de palma a partir de 2016, com mais de 200 mil toneladas de biodiesel/ano (BIODIESEL BRASIL, 2014).

1.1.2. Características e ciclo de vida da palma

A palma proveniente do continente africano e se caracteriza por crescer nos trópicos úmidos e precisa de condições de temperatura e umidade adequadas (Zeven, 1964, Hartley, 1977). A palma geralmente precisa de três anos para começar a produzir

os frutos que contém o óleo. Estes frutos são formados em cachos que depois da extração do óleo se obtém os cachos vazios (EFB). A partir do 3º ano começam a produzir fruto, chegando a sua maturidade entre o sétimo ou oitavo ano, sendo de 25 a 30 anos o ciclo de vida (PROJETO POTENCIALIDADES REGIONAIS, 2013).

1.1.3. Importância do óleo da palma nos biocombustíveis

O Brasil se propôs aumentar a matriz energética sustentável em 18% até 2030, no qual o consumo de biocombustíveis é impulsionado por políticas governamentais, fomentando o desenvolvimento de novas tecnologias na produção do Bioetanol e do Biodiesel (EPE, 2007). O biodiesel pode ser definido como uma mistura de monoésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos de cadeia longa, que são obtidos de fontes vegetais, animais ou microbianas; entretanto o diesel é obtido de uma fração da destilação do petróleo envolvendo uma mistura de hidrocarbonetos lineares, ramificados, cíclicos e poli-condensados (FONTANA, 2011). Do ponto de vista ambiental o biodiesel é menos poluente e contribui ao equilíbrio da natureza.

A partir de 2010, iniciou-se a pesquisa do óleo da palma como um possível substituto da soja na produção de biodiesel no Brasil, com as pesquisas do grupo de pesquisa do Dr. Luiz Pereira Ramos - UFPR (FONTANA, 2011). Os primeiros intentos de equacionar a reação tanto de transesterificação quanto de esterificação foram feitos por RAMOSA et al. (2015). Posteriormente foram analisadas características intrínsecas do óleo da palma, sendo interessante o elevado conteúdo de carotenoides que lhe protegem da oxidação física e da auto-oxidação. Ácidos graxos de cadeia longa, saturados e insaturados foram detectados (g.L^{-1}): Láurico <1,0; Palmítico 44,3; Oleico 38,7; Linoleico 10,5; Esteárico 4,6; Mirístico 1,0; outros 0,9 (FONTANA, 2011). Nas perspectivas dos novos desafios dos biocombustíveis no Brasil e especificamente do Biodiesel, o óleo da palma é um excelente substrato a ser aproveitado.

1.1.4. Mercado mundial da palma

O sudeste de Ásia ressalta pela produção abundante de óleo de palma. Malásia é o maior produtor a nível mundial, sendo a quarta indústria mais desenvolvida nesse país (CHUA, 2010; WU et al., 2010), e é o maior exportador de óleo de palma do

sudeste de Ásia e do mundo (WU et al. 2009) (Figura 1-3). Em 2013, Malásia tem destinado 15% de terra ao cultivo de palma obtendo 19 milhões de toneladas de óleo de palma deixando 83 milhões de toneladas de biomassa (MPOB, 2014). Os maiores importadores de óleo de palma de Malásia, em 2012 foram China, Índia, Paquistão, Estados Unidos, Singapore, Japão, Iran, Vietnam, Egito (WU et al., 2009). Em 2015, Malásia continua sendo o maior produtor de óleo de palma a nível mundial, sendo os maiores importadores de óleo, Índia e China (TRADEMAP, 2016).

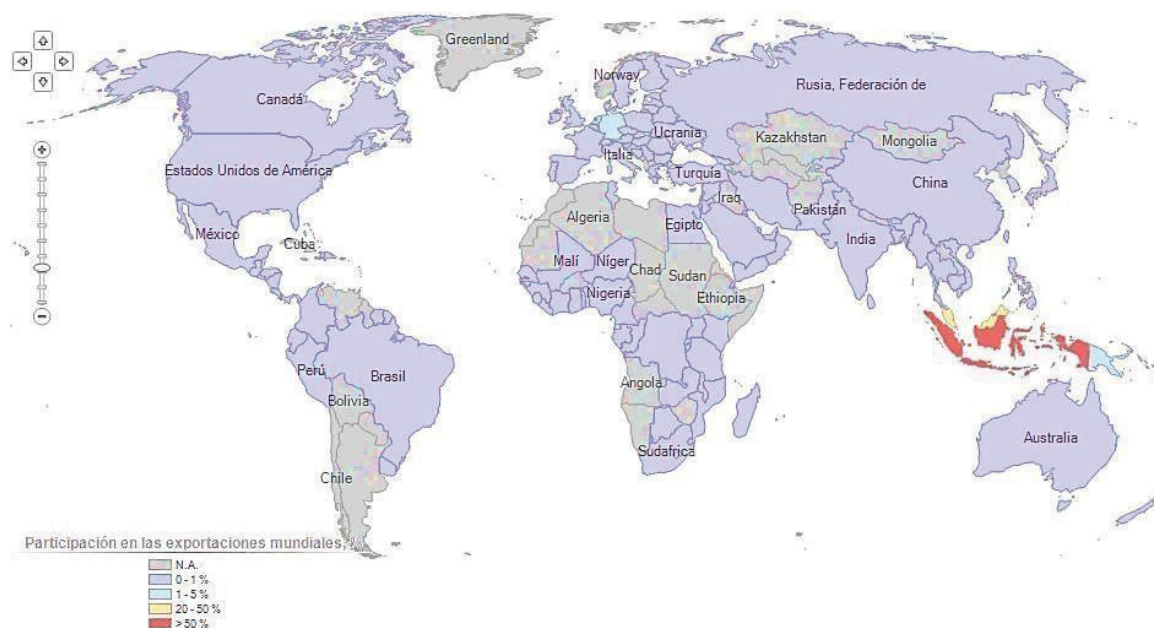


Figura 1-3. Concentração de países produtores e exportadores de óleo cru de palma em 2015. Fonte: TRADEMAP, 2016

Brasil, além de ser uma potencia no Latino-América em temas energéticos, é um dos principais produtores de óleo de palma. Atualmente é o terceiro país na América do sul que produz óleo da palma, depois da Colômbia e do Equador, e em nível mundial é considerado o 15° produtor (TRADEMAP, 2016). Brasil conta com terras adequadas no norte e no nordeste do país que são interessantes desde o ponto de vista climático por brindar no ano todo, as condições para que as plantações de *Elaeis guineenses* sejam favorecidas. Segundo CORAL et al. (2015) foram instaladas 13 plantas piloto para o processamento do óleo da palma, tendo uma projeção da produção de 751 milhões de óleo por ano.

1.1.5. Resíduos da palma

Como consequências da grande demanda que tem o óleo da palma na utilização em biocombustíveis, grandes áreas de cultivo são utilizadas e são gerados grandes quantidades de resíduos. Problemas de contaminação ambiental aparecem como a queima de troncos, galhos, cascas dos frutos, a eliminação dos efluentes nos vertedouros, afetando na saúde da população (TING et al., 2013). Foi reportado que por uma tonelada de frutos de palma processadas são produzidas 200,0 kg de óleo de palma, 220,0 kg de EFB, 135,0kg de fibra prensada da palma (FFP), e mais de 600,0kg de efluentes líquidos saídos da moenda (CORLEY e TINKER, 2008; SHINOJ et al., 2011; STICHNOTHE e SCHUCHARDT 2011). Tem-se projetado para 2020 uma produção de 85 até 110 milhões de toneladas de biomassa de palma (MPOB, 2014). Na figura 1-4, a biomassa da palma é apresentada.



Figura 1-4. Biomassa obtida da palma

1.1.6. Cachos vazios do fruto da palma (EFB)

Os “Empty Fruit Bunches” (EFB) são os cachos vazios depois de removidos os frutos da palma onde é encontrado o óleo e que são liberados e descartados no processo de prensagem. Pesquisas destacam que os EFB são uma matéria prima importante, porque é formado por celulose (glucano), hemicelulose (xilano e arabinano) e lignina (NOOMTIM e CHEIRSILP, 2011). A ideia de utilizar os EFB como um substrato é atrativa porque é de baixo custo e abundante; além, encontraríamos uma saída

amigável ao meio ambiente evitando problemas de contaminação ambiental e se promoveriam pesquisas baseadas na inovação para desenvolver novos produtos biotecnológicos.

1.1.7. Características dos EFB

As fibras dos EFB se caracterizam pela estrutura compacta e rígida que são associadas à celulose, hemicelulose e a lignina. Separar estas frações é o desafio dos pesquisadores. Pre-tratamentos ácidos, alcalinos, explosão a vapor, hidrólise enzimática são utilizados, chegando-se a determinar sua composição completa: celulose (30-40%), hemicelulose (20-25%) e de lignina (20-35%), além de pectinas e cinzas (SHINOJ et al., 2011).

A tendência dos estudos destaca que os tratamentos ácidos fazem que a estrutura da hemicelulose, que é amorfa e com menor grau de polimerização que a celulose (>5000), seja facilmente hidrolisada e liberada (HAMILTON, 1962; YING et al., 2014). No trabalho de YING et al. (2014) usando 2%(w/w) H₂SO₄, 84% das hemicelulose foram extraídas, sendo a xilose e arabinose as pentoses liberadas. No trabalho de NOOMTIM e CHEIRSILP (2011), se demonstra que tem máximos rendimentos de açúcares usando entre 1,5 e 2,0% de H₂SO₄. Posteriormente as hidrolises alcalina, são utilizadas para extrair a lignina. A celulose e o último componente, sendo degradado até glicose por hidrolise enzimática. Estes açúcares podem ser usados como substrato em fermentações microbianas (YING et al., 2014). Cabe ressaltar que a natureza fenólica da lignina pode atuar como inibidor das reações enzimáticas da celulose, por isso a sequência na ordem do processo (CONVERSE et al., 1990).

A lignina dos EFB é considerada um material com potencial, pelas aplicações na indústria de cosméticos, farmacêuticos, polímeros, resinas e biocombustíveis. Os estudos de MEDINA et al. (2016), se mostraram que os principais componentes da lignina são ácidos fenólicos unidos a éster, tais como o ácido p-hidroxibenzoico e o ácido ferrúlico; além disso, que a lignina solubilizada usando 2,5%(w/w) NaOH, tem capacidades antimicrobianas contra *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*(Gram

negativas) e *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (Gram positivas) e tem elevado potencial antioxidante.

1.1.8. Aproveitamento dos EFB

Os EFB atualmente são utilizados como matéria prima na produção de metano ou biogás em câmaras anaeróbias (MATA- ALVARES et al., 2000; Menon et al., 2003; MADAKI e SENG, 2013). Também foram reportados como substrato em atividades de compostagem, para melhorar a qualidade das terras de cultivo; além disso, foram identificados microrganismos nativos neste processo, mostrando o papel nos processos catabólicos da biomassa vegetal, destacando bactérias termófilas com capacidades de produção de enzimas celulolíticas e actinomicetes com potencial na produção de antibióticos (ZAINUDIN et al., 2013; TING et al., 2013).

Na experiência de BAHARUDDIN et al. (2009), a β -glucosidase, CMCCase y FPase de *Aspergillus niger*, foram produzidas usando fermentação em estado sólido. As atividades enzimáticas foram de $19,02 \pm 0,85$ (β -glucosidase), $6,36 \pm 0,38$ (CMCase) e $4,56 \pm 0,26$ U.g⁻¹ (FPase). A atividade enzimática em conjunto favorece a rápida hidrólise dos materiais lignocelulolíticos, é uma afirmação baseado nos experimentos de BAKAR et al. (2010), quando utilizando os EFB construiu um consorcio microbiano produtor de enzimas celulolíticas. A produção de biocombustíveis como o bio-butanol ou a mistura de acetona, butanol e etanol (ABE), foi reportada usando os açúcares dos EFB. Segundo NOOMTIM e CHEIRSILP, (2011), a produção de ABE por *Clostridium acetobutylicum* foi de $1,06 \pm 0,17$ g.L⁻¹.

1.2. RHIZOPUS

1.2.1. Classificação e importância biotecnológica de *Rhizopus*

Os fungos são organismos eucarióticos e heterotróficos, que podem colonizar ambientes próximos usando estruturas como as hifas, micélios e esporas que podem ser produzidas de modo assexuado e sexuado. Eles são classificados em quatro filos, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, e Basidiomycota (LENNARTSSON et al., 2012). Os Rhizopus pertencem a classe Zygomycetes com 7 ordens, 32 famílias, 130 gêneros e 900 espécies. São chamados de Zygomycetes pela presença de zigosporos,

que estão desenvolvidos dentro de um zigospório. O micélio geralmente é cenocítico, apresentando septos próximos aos órgãos de reprodução. Pertencem à ordem Mucorales, família Abidiaceae e género *Rhizopus* (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Estes fungos são encontrados no mundo todo apresentando um comportamento saprofito; isto é que utilizam a matéria orgânica em decomposição para aproveitar seus nutrientes e desenvolver-se. Tem importância industrial e biotecnológica, por exemplo, na indústria dos alimentos fermentados ao produzir o Tempeh obtido a partir da fermentação da soja com *R. oligosporium*, ácidos orgânicos como ácido fumárico e láctico, blocos de construção ou precursores na biossíntese de biopolímeros (YIN et al., 1998; BAI et al., 2003), fornecer enzimas tipo amilases, lipases, celulasas, proteases, tanases, fitases (SAHA et al., 2004), sendo importantes em tarefas de biorremediação como degradação de azo-corantes (AKSU et al., 1999; AKSU et al., 2000) e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (SALICIS et al., 1999; KRIVOBOK et al., 1998).

1.2.2. Potencial de *Rhizopus* na produção de ácidos orgânicos

A partir dos 1920, foram identificados diferentes *Rhizopus* com capacidade de produzir ácido fumárico. Comprovou-se também que são sintetizados outros compostos tais como o ácido láctico, málico, acético (TAKAHASHI et al., 1927), inclusive alguns podem formar misturas de ácidos como o ácido succínico e ácido oxálico (BUTKEWITSCH, 1929). As espécies mais produtoras de ácido fumárico reportadas são *R. oryzae*, *R. formosa*, *R. arrhizus* e *R. delemar* (FOSTER e WAKSMAN 1938).

Um interessante estudo feito por ABE et al. (2007), mostrou que *R. oryzae* pode se comportar metabólicamente de duas formas dependendo da presença de uma enzima chamada lactato desidrogenase "LDHA", isto é, se a LDHA é expressada no microrganismo o ácido láctico é formado, e se não é expressada são formadas outras espécies de ácidos, como o ácido fumárico e o ácido málico. Este último subgrupo que não expressa a LDHA, denomina-se *R. delemar* (ABE et al., 2007).

1.2.3. Biossíntese de ácido fumárico por *Rhizopus*

Os monômeros de açúcar são as unidades que iniciam os processos metabólicos de obtenção de energia na forma de ATP e, também dos precursores de outras moléculas. A glicólise é a primeira etapa catabólica, pois tem atividade enzimática hidrolítica, degradando os monômeros em moléculas mais simples até o piruvato. A partir desta molécula podem ser ativadas outras vias metabólicas, como a do ciclo de Krebs onde os transportadores de prótons e elétrons tem intensa atividade, favorecendo a diferença de potencial na membrana mitocondrial formando ATP. O ciclo de Krebs também é importante devido a intermediários que são sintetizadas, uma de elas, o ácido fumárico. ROMANO et al., 1967 e OVERMAN et al. (1969), mostraram a "Piruvato carboxilase" que favorece a fixação do CO₂ ao piruvato e junto a "Malato desidrogenase" e "Fumarase", sintetizar-se-ia o ácido fumárico (AF), em uma relação de 1mol de ácido fumárico/1 mol de glicose (via oxidante) ou 2 moles de ácido Fumárico /1 mol de glicose (via redutora) (OSMANI, 1985; OVERMAN et al., 1969; GANGL et al., 1991). O rendimento de ácido fumárico não é favorável quando é formado pelo ciclo de Krebs, porque tem que priorizar a formação de energia, mas pode se sintetizar por via citosólica, onde as enzimas antes citadas cumprem a mesma função (KENEALY et al., 1986; OSMARI e SCRUTTON, 1985; PELEG et al., 1989; FOSTER e WAKSMAN, 1938).

Quando a xilose entra ao metabolismo dos *Rhizopus*, podem ocorrer algumas desvantagens, por falta de transportadores de elétrons (NADH+/NAD+), ou de ATP, porque os monômeros em degradação não são degradados na rota metabólica. Por este motivo se tem baixas quantidades de ácido fumárico a partir da xilose, diferente da glicose que é metabolizada rapidamente. Segundo GUANYI et al. (2015), existem gargalos na via metabólica da xilose como a acumulação de xilitol, atrapalhando o fluxo normal do metabolismo, por tanto a xilulose e xilulose-5-fosfato que são formados a partir desta, não são produzidos. A adição de cofactores como "ácido nicotínico" e "vitamina C" ajudam na formação de NADH/NAD y ATP, que favorecem a catalise do xilitol (SAN et al., 2002; Yu et al., 2011). Além disso, a presença do oxigênio é de vital importância no processo fermentativo para satisfazer as reações redox (NEVES et al., 2000) e também da adição externa de alguns aminoácidos, como a prolina e serina,

que se sabe, inibem suas próprias biossínteses favorecendo a síntese do ácido fumárico (GUANYI et al., 2015). Na figura 1-5, se apresenta o metabolismo da glicose e xilose na produção de ácido fumárico.

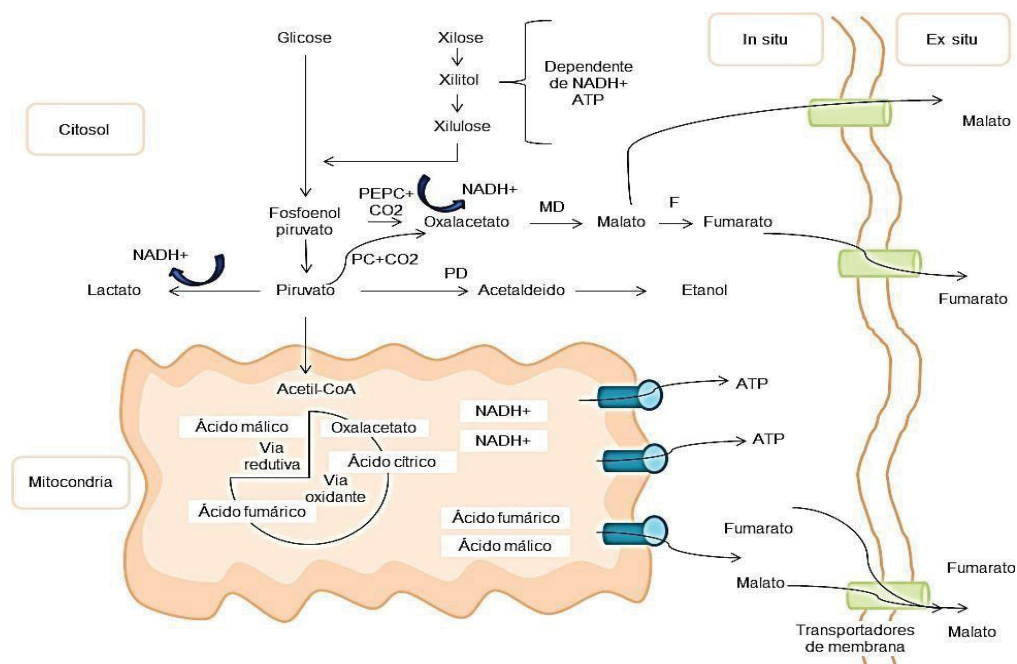


Figura 1-5. Rota metabólica usada por *Rhizopus oryzae* para a obtenção de ácido fumárico, ácido láctico e etanol, modificada de Zhang et al. (2012) e de Wang et al. (2015). Onde PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilase), PC (Piruvato carboxilase), PD (Piruvato desidrogenase), MD (Malato deidrogenase), F (Fumarasa). Fonte (AUTOR).

1.3. Produção biotecnológica de ácido fumárico

1.3.1. Ácido Fumárico

É um ácido orgânico, definido como um ácido dicarboxílico de quatro carbonos com uma dupla ligação e dois grupos carboxílicos terminais (ZHOU et al., 2011). Inicialmente foi isolado de uma planta chamada "*Fumaria officinalis*", da qual se derivou o nome (ROA ENGEL et al., 2008). É um intermediário metabólico do ciclo dos ácidos tricarboxílicos que participa na regeneração do ácido cítrico e fornece agentes redutores para a produção de energia química (ATP). O ácido fumárico é importante sendo utilizado como um acidulante em alimentos; participa na fabricação de resinas de papel, resinas alquiladas, resinas de poliéster, nas sínteses de ácido maleico e

plastificantes (ROA ENGEL et al., 2008); além disso, é importante como insumo em alimentos, porque inibe o crescimento de microrganismos por sua baixa acidez, sendo 1.5 vezes mais ácido que o ácido cítrico (YANG et al., 2011). Também é um valioso produto intermediário para a produção de ácido L-málico e L-aspártico (GANGL et al., 1990; GOLDBERG et al., 2006). Atualmente é produzida em escala laboratorial e planta piloto, por fermentação microbiana (Tabela 1-1).

O ácido fumárico também é produzido petroquimicamente a partir do anidro maleico, que a sua vez é obtido do butanol, sendo este processo não amigável ao meio ambiente. Atualmente, com os constantes aumentos dos preços do petróleo a produção química não é muito viável; além disso, os mercados de Norte América e Europa diminuiriam sua expansão devido as restrições dos ácidos orgânicos sintéticos (RESEARCH REPORTS, 2016). Por isto nos últimos anos alguns microrganismos têm sido avaliados para produção de ácido fumárico. Os fungos filamentosos podem usar glicose e sintetizar muitos componentes intracelulares. As espécies de *Rhizopus* podem usar como fonte de carbono açúcares como a glicose e a xilose (Tabela 1-1 e 1-2). A glicose é utilizada principalmente para a produção de ácido fumárico, pois os intermediários metabólicos continuam na via do oxalacetato e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos onde é formado (WANG et al 2015).

Deve-se destacar que a xilose foi usada pela primeira vez como substrato para a produção biotecnológica de ácido fumárico no estudo de PUHAKKA et al. (1988). Em seguida, KAUTOLA et al., (1989) usando micélio imobilizado de *Rhizopus arrhizus* produziu 16,4g.L⁻¹ de ácido fumárico a partir de xilose, em 10 dias, com uma relação de C:N de 160, utilizando um planejamento estatístico experimental.

1.3.2. Produção de ácido fumárico usando resíduos vegetais

Na busca de outros tipos de substratos que sejam rentáveis e que contenham uma boa concentração de açúcares, como a hexoses e pentoses, pesquisaram-se o melão, a sucrose, e amido, que são substratos muito ricos em glicose; embora a síntese química a partir do anidro maléico em termos econômicos resultava mais rentável, por isso deixou-se por um tempo o intento de aperfeiçoar o processo biotecnológico de produção de ácido fumárico por via microbiana. (MIALL, 1978).

Os resíduos agroindustriais são bons substratos para obter-se açúcares fermentescíveis usando técnicas de hidrolises ácidas, enzimáticas ou usando tratamentos térmicos. O bagaço de mandioca contém 30% até 50% de amido solúvel (PANDEY et al., 2000), tendo sido aproveitado por CARTA et al. (1999) hidrolisando enzimáticamente a bagaço de mandioca, obteve-se $2,76 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido fumárico e depois de um processo de otimização obteve-se $21,28 \text{ g.L}^{-1}$. Wang et al. (2015), utilizam os hidrolisados do farelo de trigo com concentrações de xilose e glicose entre $38,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,8 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente, obtendo uma concentração de $5,8 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido fumárico, logrando aperfeiçoar a produção até $20,2 \text{ g.L}^{-1}$. Estes resultados apresentam a glicose como um melhor substrato que a xilose. Alguns exemplos são apresentados na Tabela 1-1.

Tabela 1-1. Produção de ácido fumárico a partir da glicose usando espécies de *Rhizopus* sp.

Cepa	Fermentador	Substrato	Produção (g L ⁻¹)	Rendimento (g.g ⁻¹)	Tempo (hora)	pH final	Autor
<i>R. arrhizus</i> NRRL 2582	Biorreator agitado	Glicose	90,00	0,70	72	6	Rhodes et al., 1962
	Biorreator agitado	Glicose	107,00	0,82	53	6	Ng et al., 1986
	Biorreator agitado	Glicose	73,00	0,72	147	5,5	Gangl et al., 1990
<i>R. arrhizus</i> NRRL 1526	Erlenmeyer	Glicose	97,70	0,81	96	6	Kenealy et al., 1986
<i>R. oryzae</i>	Tambor rotatório (RBC plus adsorção)	Glicose	92,00	0,85	24	4,5	Cao et al., 1996
	Tambor rotatório (RBC)	Glicose	75,50	0,75	24	5	Cao et al., 1997
	10-1 Biorreator air lift	Glicose	37,80	0,75	46	5,5	Due et al., 1997
	Coluna de Bolhas	Glicose	37,20	0,53	Nd	nd	Zhou et al., 2002
	Tanque agitado	Glicose	56,20	0,54	Nd	nd	Fu et al., 2010b
	Tanque agitado	Glicose	41,10	0,48	Nd	Nd	Huang et al., 2010
	Tanque agitado	Glicose	32,10	0,45	Nd	Nd	Kang et al., 2011
<i>R. nigricans</i>	Tanque agitado	Glicose	30,20	0,28	Nd	Nd	Huang et al., 2011
	Erlenmeyer	Glicose	14,70	0,55	Nd	nd	Foster and Waksman, 1938
	Erlenmeyer	Glicose	20,00	0,66	nd	nd	Romano 1967
	Tanque agitado	Glicose	130,00	0,40	142	nd	Lingand Ng 1989
<i>R. delemar</i>	Tanque agitado	Glicose	40,0	0,31	Nd	Nd	Riscaldati 2000
	Erlenmeyer	Glicose	38,90	Nd	72	Nd	Zhou et al., 2011

Tabela 1-2. Produção de ácido fumárico a partir de xilose e resíduos vegetais usando *Rhizopus* sp., considerando o tamanho do pellet no pre-cultivo.

Cepa	Fermentador	Substrato	Produção (g.L ⁻¹)	Rendimento (g.g ⁻¹)	Tamanho de pellet	Condições	Autor
<i>R. arrhizus</i> TKK 204-1	Erlenmeyer	Xilose	16,4	0,23	Nd	Pellet imobilizado, 250rpm, 33°C (inoculo e fermentação, 9 dias)	Kautola et al. (1989)
	Erlenmeyer	Hidrolisado de farelo de trigo	20,2	ND	0,55mm	72h	Wang et al. (2015)
	Tanque agitado	Estercol	31,0	0,31	Nd	Nd	Liao et al., 2008
<i>R. oryzae</i>	Tanque agitado	Palha de milho	27,8	0,35	Nd	Nd	Xu et al., 2010
	Tanque agitado	Amido de milho	45,0	0,47	Nd	Nd	Huang et al., 2011
	Tanque agitado	Bagaço de mandioca	20,2	ND	Nd	ND	Wang et al., 2015
<i>Rhizopus</i> <i>sp.</i>	<i>Erlenmeyer</i>	Bagaço de mandioca	21,28	ND	ND	ND	Carta et al. (1999)
	Erlenmeyer	Farinha de batata	43,5	0,53	ND	ND	Moresi et al., 1991
<i>R. nigricans</i>	Erlenmeyer	Amido de milho	71,9	0,6	Nd	nd	Moresi et al., 1992
	Leito fluido	Melaço	17,5	0,36	Nd	nd	Petruccioli et al., 1996

1.3.3. Inibidores da fermentação

O propósito da hidrólise ácida é liberar a fração dos açúcares de cinco carbonos como a xilose e a arabinose, mesmo assim são produzidas quantidades baixas de glicose. Uma das consequências da hidrólises é a formação de subprodutos que tem efeitos negativos nos microrganismos que tentam fermentar os açúcares ou aproveitar alguma substância nutritiva do hidrolisado (Figura 1-6). Os derivados dos furanos como

os furfurais e o hidroximetilfurfural (HMF), são produzidos a partir da degradação das pentoses e hexoses respectivamente. O HMF é produzido em baixas concentrações porque é originado da glicose, que se encontra em uma concentração menor, e os furfurais em maiores quantidades. Embora, dependa muito do tipo de biomassa e das condições da hidrólise para obter o tipo e as concentrações dos inibidores. Nos processos de fermentação são evidentes quando os microrganismos não têm um crescimento bom ou não produzem metabolitos de interesse. Esta resposta do microrganismo ao meio está relacionada com as variáveis fisiológicas de cada microrganismo, parâmetros de cultivo, como oxigênio dissolvido, pH, temperatura (MUSSATTO et al., 2004).

Também os produtos derivados da degradação da lignina, como os compostos aromáticos, poliaromáticos, fenólicos e aldeídos tem uma importância especial, porque afetam o crescimento microbiano ao causar alterações na permeabilidade da membrana (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000). Estes subprodutos como os furanos, Hidroximetilfurfural (HMF) e outros componentes fenólicos tóxicos são os principais inibidores de crescimento microbiano. Leveduras como *Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente usadas principalmente para a bioconversão de açúcares lignocelulósicos em etanol, são inibidas totalmente quando HMF é adicionado (1.0-1.5 g.L⁻¹) (DELGENES et al., 1996).

O ácido fórmico é formado a partir da degradação do furfurais e também das pentoses. O ácido acético é o maior ácido alifático produzido na hidrólise ácida, porque se desprende das autohidrólises da hemicelulose acetilada (PALMQVIST et al., 2000). O ácido acético tem efeitos tóxicos alterando as propriedades da membrana lipossolúvel e a descarga de prótons provocando a morte celular. Embora, segundo (FELIPE et al., 1995), concentrações abaixo de 1,0 g.L⁻¹ de ácido acético melhoram a bioconversão de xilose a xilitol durante o metabolismo de algumas leveduras, porque aumenta a difusão interna dos prótons. O ácido fórmico, acético e levulínico podem ter maiores efeitos inibitórios em leveduras como *P. tannophilus* e *P. stipitis*, na fermentação da xilose (VOGEL-LOWMEIER et al., 1998). Os compostos fenólicos em maior concentração que 0,1 g.L⁻¹ inibem o crescimento microbiano de algumas leveduras como *c. guilliermondii* (VILLA et al., 1998).

Os compostos fenólicos desprendidos a partir das hidrólises alcalinas são ácido tânico, siríngico, vanílico, capróico, caprílico, pelargônico, palmítico e terpenos (BRANCO et al., 2007; MUSSATTO et al., 2004). Embora, os subprodutos procedentes das hidrólises ácidas da fração da lignina são o ácido p-hidroxibenzoico e o ácido ferrúlico (MEDINA et al. 2016). Em resumo, os inibidores dos hidrolisados da biomassa vem dos produtos da degradação de açúcares ou da lignina que são derivados da estrutura lignocelulósica (MUSSATTO et al., 2004).

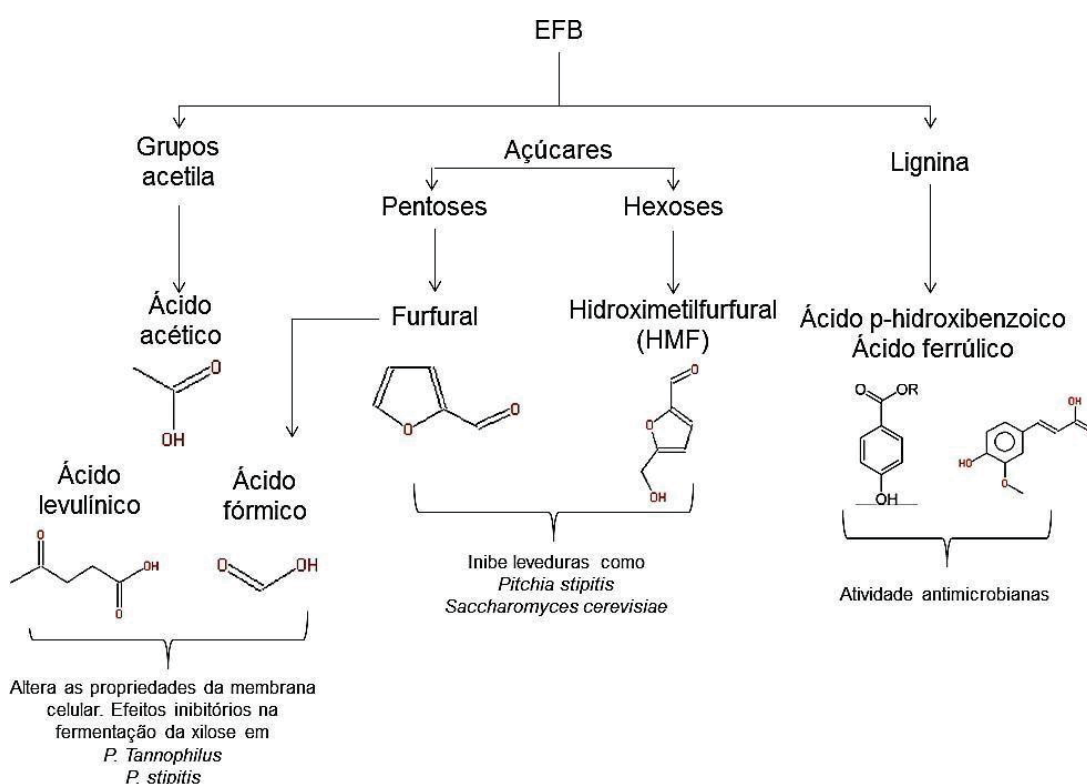


Figura 1-6. Subprodutos obtidos a partir das hidrólises ácidas dos EFB. Fonte (AUTOR)

1.3.4. Requerimentos nutricionais e fatores relevantes na produção de ácido fumárico.

1.3.4.1. Separação do processo fermentativo: Desenvolvimento do inoculo.

Nos últimos anos tem se incrementado a informação sobre a biossíntese de ácido fumárico. O fracionamento do processo em duas etapas foi um dos passos chaves. O desenvolvimento do meio semente favoreceu a otimização da morfologia, achando nos pellets que são formas arredondadas de micélio como forma de crescimento, a melhor forma para produzir ácido fumárico (TENG et al., 2009; ZHOU et al., 2011; WANG et al., 2015).

1.3.4.1.1. Meio semente.

No meio semente para a produção do inoculo é importante a fonte de carbono, sendo a glicose o monossacarídeo mais utilizado, entretanto, o uso de xilose vem sendo pesquisada (WANG et al., 2015). A fonte de nitrogênio tem um impacto positivo na formação de biomassa, alguns estudos mostraram que a peptona de soja favorece a formação de pellet ZHOU et al. (2011). O carbonato de cálcio é um fator importante para que os pellets tenham uma superfície lisa e suave, que ajude a incrementar difusão dos gases (LIAO et al., 2007). O pellet favorece a maior troca gasosa nas células e permite a acumulação de ácido fumárico (Figura 1-7 e 1-8). Os sais inorgânicos favorecem o aumento síntese da biomassa, resultando em diferentes tipos de morfologias como grumos, micélios e biofilmes, que diminuem a produção de ácido fumárico (ZHOU et al., 2011).

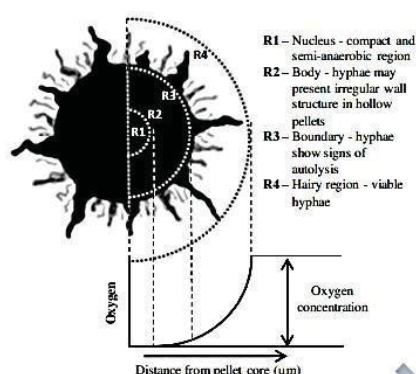


Figura 1-7. Regiões do pellet fúngicos e seu gradiente de oxigênio na fermentação submersa, Fonte: ESPINOZA-ORTIZ et al., 2015.

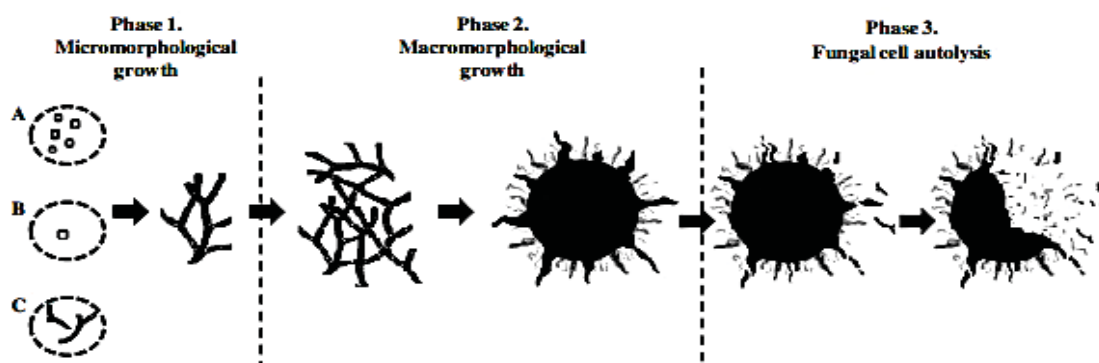


Figura 1-8. Filamento do crescimento fúngico em cultivos submersos. Fase 1- Crescimento micromorfológico, aglutinação e fase de germinação de esporos, crescimento de hifas e ramificação. Os pellets podem ser originados de: (A) esporos coagulantes, (B) um único esporo, ou (C) hifas aglomeradas; Fase 2 - Crescimento macromorfológico, rede de hifas e formação de pellets; Fase 3 - autólise de células fúngicas, erosão e desintegração dos grânulos. Fonte: Espinoza-Ortiz et al., 2015

1.3.4.1.2. Meio de fermentação

O segundo meio ou meio de fermentação é onde o ácido fumárico será produzido. Este processo se caracteriza por ser a fonte de nitrogênio limitante, ou seja, deve ter concentrações muito baixas. Com esta condição do meio é favorecida a condição de estresse para o fungo *Rhizopus*, limitando a formação de biomassa e concentrando a formação de ácido orgânico como o ácido fumárico. São descritas condições alcalinas facilitadas pelas altas concentrações de carbonato de cálcio (40 g.L^{-1}) (ZHOU et al., 2011; Wang et al., 2015). O carbonato de cálcio atuará como um agente quelante formando fumarato de cálcio que tem baixa solubilidade em água, favorecendo que a recuperação do ácido seja mais fácil; além disso, é fonte de CO_2 , que é importante para a formação de oxalacetato, precursor do ácido málico e fumárico. Tem sido reportado também a produção de ácido fumárico em meio ácido (pH: 3.6), esta metodologia é importante porque prescinde do carbonato de cálcio em excesso, diminuindo a quantidade de resíduo focando nas constantes de dissociação do ácido fumárico ($\text{pKa}_1=3.02$; $\text{pKa}_2=4.38$); embora, este processo seja dependente do fornecimento externo de CO_2 . As duas metodologias oferecem caminhos para a obtenção deste ácido (ENGEL et al., 2011).

1.3.5. Produção de ácido fumárico usando outras tecnologias

1.3.5.1. Uso de biorreatores e células imobilizadas

Como foi descrito anteriormente o micélio em pellet é a melhor forma de crescimento para a produção de ácido fumárico; embora, o micélio oferece a construção de um biofilme, o que faz uma estrutura interessante de usar em um biorreator de lei to fluidizado porque o meio de cultivo passaria através dele constantemente assegurando uma distribuição homogênea por todo o biofilme (FEDERICI, 1993). PETRUCCIOLI et al. (1996), produziu $12,3 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido fumárico com o mesmo biorreator, tendo um rendimento de 33,56% e uma produtividade de $0,256 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, usando como substrato melação de cana em um tempo de 48h por cada batch, somando 8 batch em tudo o processo; entretanto com a utilização de um rotor de biofilme com coluna de absorção de ácido fumárico obteve-se uma produção de 85 g.L^{-1} a partir de 100 g.L^{-1} de glicose em 20 horas, com um rendimento de 91% e uma produtividade de $4,25 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, em um processo alimentado, sendo uma das maiores vantagens, pois não aconteceu inibição por produto e se diferenciou do processo de fermentação submersa, que ofereceu um rendimento de 65% (CAO et al., 1996).

1.3.5.2. Sacarificação em simultâneo (SSF)

O primeiro reporte da utilização de processos como a sacarificação fermentação em simultâneo (SSF) para a produção de ácido fumárico, foi descrito por DENG et al. (2012), onde a cepa *Rhizopus oryzae* ME-F12, com elevada atividade glucoamilase foi utilizada para realizar um pre-tratamento de hidrolise enzimática e liberar glicose contida no amido de milho, utilizando-a para a produção de ácido fumárico por fermentação microbiana, aproveitando a capacidade da glucoamilase, que é insensível à repressão catabólica do processo. Esta cepa elevou a produção em 1.28 vezes chegando até $39,80 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido fumárico a partir de 80 g.L^{-1} , embora quando a concentração do amido foi de 100 g.L^{-1} a produção foi de $32,18 \text{ g.L}^{-1}$ e a produtividade máxima foi de $0,44 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

1.3.5.3. Otimização do meio de fermentação

O meio de fermentação é aquele onde a partir dos nutrientes vai-se formar o ácido fumárico. Como é descrito na Figura 1-4, alguns cofatores são necessários para facilitar a rota de biossínteses de ácido fumárico. Baseados nos estudos de WANG et al. (2013), a análise do perfil metabólico de *R. oryzae* FM19 usando glicose, for muito importante para conhecimento dos metabolitos que podem desacelerar a rota do ácido fumárico. Foram detectados que a biossínteses de ácido cítrico, ácido oxalacético, 2-oxoglutarato e o ácido láctico sintetizado, nas rotas de Embden-Meyerhof-Parnas e no ciclo de Krebs e que os aminoácidos como a prolina, alanina, valina e leucina afetam a biossíntese de ácido fumárico. Com a adição externa de estes componentes a produção aumentou em 14%, chegando até 56,5 g.L⁻¹, a partir de 80 g.L⁻¹ de xilose.

A adição de cofatores para solucionar os gargalos foram avaliados com sucesso na experiência de WANG et al. (2015), quando o meio continha elevadas concentrações de xilose a partir dos hidrolisados do farelo de trigo (38 g.L⁻¹). A produção de ácido fumárico foi de 5,8 g.L⁻¹ sem otimização do meio (30°C, 200 rpm). Com a adição de ácido nicotínico (25 mg.L⁻¹), vitamina C (0,1g.L⁻¹), agitação (230 rpm), citrato de sódio (0,3 g.L⁻¹), prolina (25 g.L⁻¹) e serina (0,4 g.L⁻¹), conseguiram elevar o título de ácido fumárico até 20,2 g.L⁻¹. Justifica-se que a adição de ácido nicotínico, vitamina C e citrato de sódio, são precursores de NADH⁺ e ATP, favorecendo nas etapas iniciais do metabolismo da xilose.

1.3.5.4. Melhoramento genético

A partir de 2012, iniciaram-se experimentos para o melhoramento genético de microrganismos, com a finalidade de aumentar a produção de ácido fumárico (ZHANG et al., 2012). *Rhizopus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Candida glabrata*, foram modificados baseando-se na sobre-expressão de enzimas para as sínteses de ácido fumárico ou seus precursores e a deleção de genes que favoreceriam a sínteses de outros compostos (Figura 1-9), (ZHANG et al., 2012; SONG et al., 2013; XU et al., 2012^a; XU et al., 2013^a; CHEN et al., 2015). O primeiro estudo focado no melhoramento de cepas de *Rhizopus* usando engenharia metabólica para a produção de ácido fumárico foi feito por ZHANG et al. (2012), apresentando rendimentos de ácido

fumárico sobre expressando dois genes que codificam duas enzimas como a “piruvato carboxilase” (PYC) que capta um mol de CO₂ à molécula de piruvato formando o oxalacetato, e a “fosfoenolpiruvato descarboxilase” (PEPC) que assimila um mol de CO₂ ao fosfoenolpiruvato para formar oxalacetato (Figura 1-5). O objetivo deste trabalho foi incrementar a fixação de CO₂ no fluxo de carbono do oxalacetato. Foi demonstrado que a sobre-expressão da PYC, favoreceu o aumento da biomassa e incrementando a concentração do ácido málico, mas a sobre expressão da PEPC favorece a acumulação de ácido fumárico. A produtividade medida a partir da Fosfoenolpiruvato carboxilase foi de 0,77 ±0,09 g.L⁻¹.h⁻¹

Escherichia coli, por sua vez foi avaliada e sobre expressou-se á enzima fosfoenol piruvato carboxilase (PPC), tendo um rendimento de 0,432 g de Ac. fumárico/g de glicose. Adicionalmente melhorou-se seu rendimento até 0,493 g ácido fumárico /g de glicose, sobre expressando o complexo succinato deidrogenase; mas o rendimento elevou-se ainda mais quando a cepa sofreu uma mutação na enzima citrato sintetase, chegando a um rendimento de 0,50 g ácido fumárico. g⁻¹ de glicose (SON et al., 2015) . Recentemente o trabalho de CHEN et al.(2015), utilizou as capacidades de *Candida grabata* para armazenar α-cetoglutarato e utilizando a engenharia genética e engenharia metabólica, conseguiu fusionar proteínas KGD2-SUCLG2, SUCLG2-SDH1 e KGD2- SDH1 para diminuir as etapas dentro da via dos ácidos tri-carboxílicos e sintetizar ácido fumárico. Além disso, conseguiu expressar dois transportadores de ácido fumárico, para alcançar uma melhoria da produção de 1,81 g.L⁻¹ a 15,76 g.L⁻¹. A importância deste trabalho é que ao ser o ácido fumárico inibidor competitivo do ácido L-málico, irã saturar o sistema de transporte, diminuindo a velocidade de liberação extracelular do ácido fumárico (CÔRTE-REAL e LEÃO, 1990).

Nos experimentos de expressão heteróloga de algumas enzimas chaves como a malato desidrogenase e fumarase pertencente a espécies de *Rhizopus* e sobre expressadas em leveduras como *Sacharomyces cerevisiae*, não tiveram bons resultados. Recentemente a inserção de genes como a fumA, fumB, fumC, no genoma de bactérias estão sendo investigados (Xu et al., 2012^a; Xu et al., 2013^a).

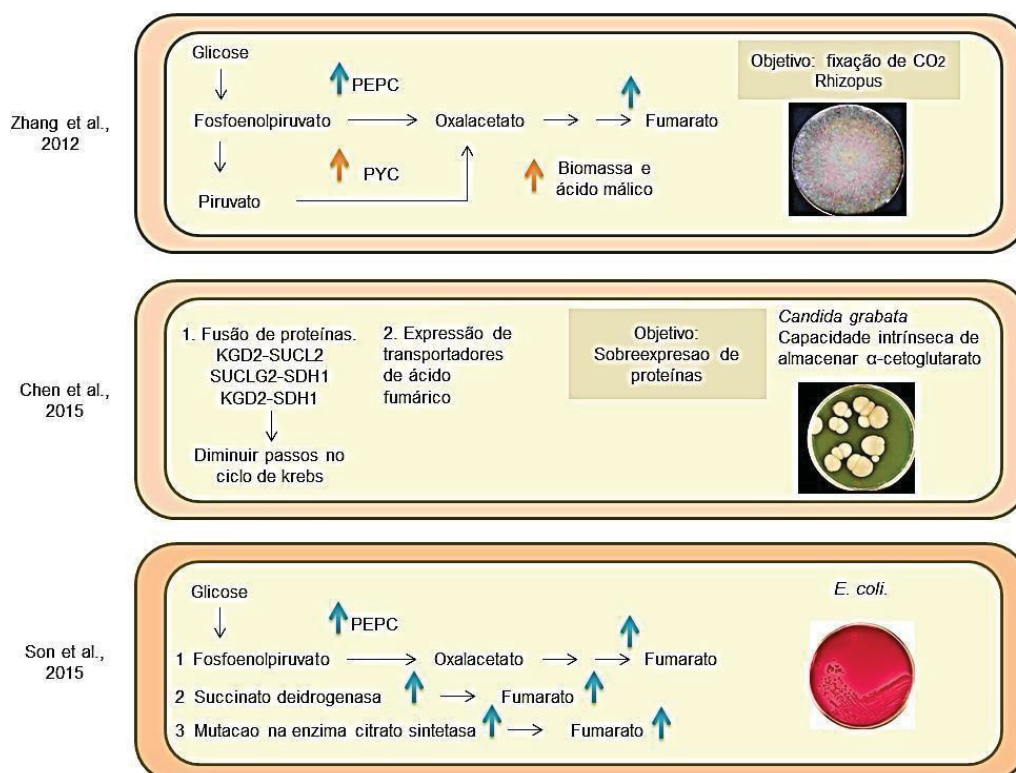


Figura 1-9. Técnicas de melhoramento genético baseado na sobre-expressão de enzimas e proteínas melhorar a produção de ácido fumárico. Fonte (AUTOR).

1.4. Potencial biotecnológico dos resíduos do processamento dos frutos da palma

O Brasil está buscando de fortalecer e diversificar sua matriz energética e especificamente dos biocombustíveis. Por isso está constantemente na procura de novas tecnologias a utilizar. A palma é uma planta de clima tropical, que precisa de condições de temperatura e umidade adequadas para se desenvolver. Por isso em 2013 foram destinadas grandes extensões de terra ao cultivo da palma no nordeste do país, para utilizar o óleo na produção de biodiesel, com o objetivo de utilizar tecnologias mais limpas e amigáveis ao meio ambiente (EMBRAPA, 2013). Por tanto é de grande interesse desenvolver novas estratégias para a reutilização dos resíduos após da obtenção do óleo de palma.

Estudos reportam que em cada tonelada de frutos processados são obtidos, 200 kg de óleo de palma, 220 kg de cachos vazios e 135 kg de fibra de palma prensada

e 600 kg de efluentes do processo de extração de óleo (CORLEY e TINKER, 2008; SHINOJ et al., 2011; STICHNOTHE e SCHUCHARDT 2011). Teoricamente cada vez mais tem-se grandes quantidades de biomassa que pode ser utilizada, em processos biotecnológicos (figura 1-10). A finalidade do levantamento de informação visa uma base científica que permita a utilização dos resíduos da palma uma plataforma de biorefinería para a obtenção de novos produtos biotecnológicos.

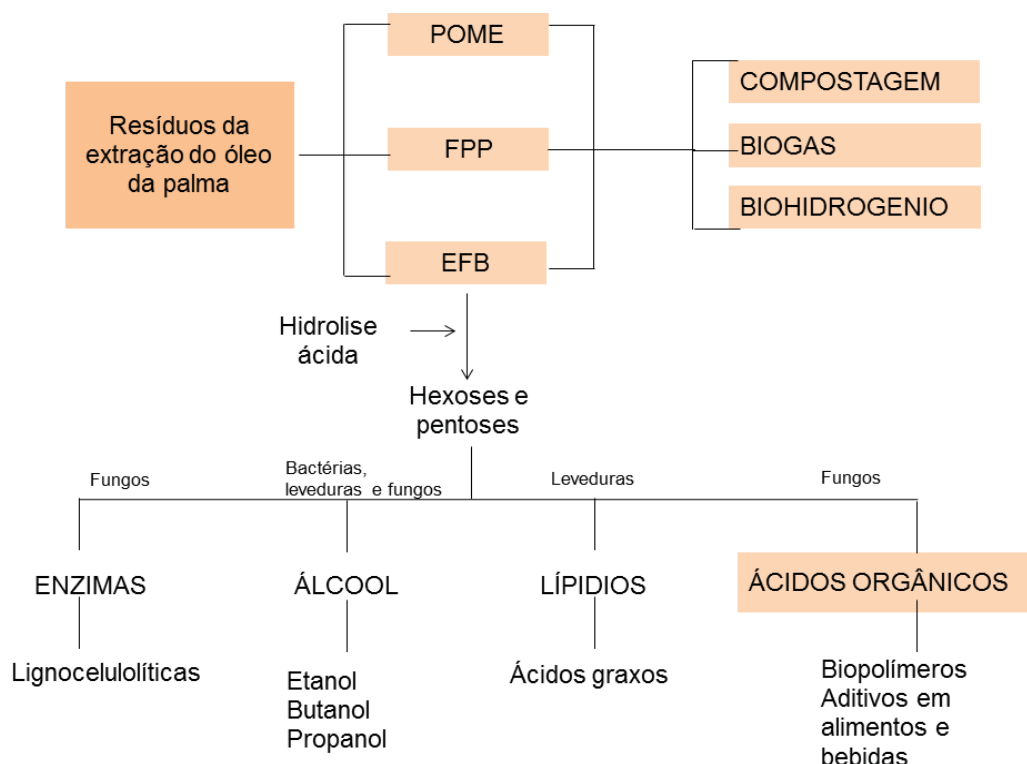


Figura 1-10. Subprodutos obtidos em processos microbiológicos e biotecnológicos a partir dos resíduos da extração de óleo de palma. Fonte AUTOR.

4.1.1. Subprodutos obtidos a partir da biomassa vegetal

4.1.1.1 Compostagem

Os cachos vazios da palma (EFB) e a fibra prensada da palma (FFP) são resíduos gerados em grandes quantidades. Têm-se reportes que os EFB são decompostos lentamente no ambiente, fazendo que pragas proliferem, trazendo mal-estar a população e causando desequilíbrios na natureza (LIM e CHAN, 1987). A

compostagem é um processo natural de decomposição biológica da matéria orgânica, catalisada por enzimas liberadas por sucessões de populações microbianas até a formação de húmus, dióxido de carbono e calor (TUOMELA et al., 2000; GOMES e PEREIRA, 2008). Por tanto este bioprocessos é ideal para fornecer ao solo, nutrientes de modo amigável ao meio ambiente.

O processo depende de cada tipo de microrganismo e de acordo com sua função específica em relação à degradação de uma parte da biomassa. Os mesófilos que são microrganismos que se desenvolvem a temperaturas entre 15 até 45°C, são os que iniciam o processo e hidrolisam açúcares e amido. Os termófilos, com uma faixa de crescimento entre 45 até 100°C, estão vinculados à ruptura das cadeias de hemicelulose, lignocelulose e lipídeos. Os fungos e actinomyces termófilos são reportados como degradadores da lignina (TUOMELA et al., 2000). Uma característica das pilhas de compostagem é que à medida que aumenta o tempo do processo, aumenta o pH da pilha, diminuindo a razão C:N e aumentando a concentração de lignina.

Diferentes tipos de microrganismos são envolvidos no processo, sendo dominantes bactérias mesófilas e termófilas, fungos e actinomicetes (TANG et al., 2004). Nos processos de compostagem usando os EFB foram reportados microrganismos predominantes com elevadas atividades enzimáticas (tabelas 1-3 e 1- 4). Os actinomicetes têm sido encontrados nas leiras de compostagem dos EFB e FPP, estes jogam um papel muito importante na degradação de fibras vegetais porque penetra na estrutura, degradando enzimáticamente o substrato vegetal (MC CARTHY, 1987). Estes procariontes podem atuar como controladores biológicos porque são capazes de produzir antibióticos, diminuindo assim a colonização de espécies patogênicas como *Rhizoctonia solani* (PATIL et al., 2010), *Fusarium oxysporum* (GETHA e VIKINESWARY, 2002), *Verticillium dahlia* (CUESTA et al., 2002). Além disso, apresentam grande potencial biotecnológico porque são modificáveis geneticamente e podem ser usados em processos de escalonamento (MC CARTHY, 1987). Na tabela 1-3 são apresentados alguns actinomicetes identificados nas leiras de compostagem de EFB.

Tabela 1-3. Bactérias mesófilas e termófilas identificadas nas pilas de compostagem dos EFB

Bactérias	Gram		Endospora		Características enzimáticas	Autor
<i>Bacillus subtilis</i>	Positiva	Aeróbio	Sim	Mesófilo e termófilo		
<i>Bacillus firmus</i>	Positiva	Aeróbio	Sim	Mesófilo e termófilo		
<i>Thermobifida fusca</i>	Positiva	Aeróbio		Termófilo		
<i>Thermomonospora</i> spp.	Positiva	Aeróbio	Sim	Termófilo		
<i>Cellulomonas</i> sp.	Positiva	Aeróbio	Não	Mesófilo		
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	Positiva	Aeróbio	Não	Termófilo		
<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	Positiva	Anaeróbio facultativo	Sim	Termófilo	Lignocelulolíticas	Zainudin et al., 2013
<i>Paenibacillus campinasensis</i>	Positiva	Anaeróbio facultativo	Sim	Termófilo		
<i>Geobacillus thermo-denitrificans</i>	Positiva	Anaeróbio facultativo	Sim	Termófilo		
<i>Pseudoxanthomonas byssovorax</i>	Ne	Ne	Ne	Ne		
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	Positiva	Anaeróbio facultativo	Não	Mesófilo	Hemicelulolíticas	
<i>Rhizobium</i> sp	Positiva	Aeróbio	Nao	Mesófilo		
<i>Ureibacillus terrenus</i>	Positiva	ne	Ne	Termófilo	Lignocelulolíticas e Hemicelulolíticas	Ting et al., 2013

Ne: Não encontrado

Tabela 1-4. Actinomicetes identificados nas pilas de compostagem os EFB e enzimas produzidas

Actinomicetes	Enzimas	Autor
<i>Nocardiopsis</i>		
<i>Streptomyces violaceorubidus</i>	Amilases, celulasas, xilanases, lignolíticas	Ting et al., 2014
<i>Streptomyces</i> sp		

Em meados dos anos 90, a utilização dos resíduos das extrações do óleo de palma, na construção de leiras de compostagem se tem reportado. THAMBIRAJAH et al. (1995) usando a FPP como fonte de carbono e esterco de caprinos, bovinos e aves como fonte nitrogenada conseguiu bons resultados. Posteriormente foram usados os EFB e esterco de vaca apresentando bons resultados na bio-transformação e liberação de cálcio (39,38 – 373,17%), fosforo (15,15 – 390,54%), potássio (45,55 – 153,66%) e magnésio (55,86 – 370,93%), (SIM e WU, 2010). Anos mais tarde, ZAINUDIN et al. (2013), se conseguiram reduzir o tempo de 60 a 40 dias usando EFB e lodo do processamento do óleo da palma, com uma relação C/N de 12,4.

KRISHNAN et al. (2016), usando EFB e POME (efluentes da moagem do óleo da palma), fez um análise da microbioma do co-compostagem, determinando que as bactérias dominantes na superfície do compôs são Nitriliruptor, Delftia, Filomicrobium, Steroidobacter e Othaekwangia, os dominantes dentro das leiras são Steroidobacter, Nitriliruptor, Anaeromyxobacter, Filomicrobium e Truepera. Os fungos dominantes na superfície são Remersonia, Inonotus, Kluyveromyces, Chaetomium, Thermomyces e Cândida e dentro da leira, Reemesonia, Inonotus, Saccharomycopsis, Chaetomium e Saccabolus.

A co-compostagem usando os resíduos da palma são importantes pelas seguintes razões: O POME oferece óleo residual, que é importante como fonte nitrogenada, sendo um substituto dos esterco animais que aumentam a liberação de CO₂, também a co-compostagem oferece uma alternativa para o tratamento dos resíduos da palma, contribuindo com a não propagação das pragas e diminuindo até 76% a emissão dos gases de efeito estufa no ambiente (KRISHNAN et al., 2016), além de promover as aplicações de fertilizantes naturais (MONICA et al., 2014) e por último as leiras de compostagem dos produtos do processamento da palma oferecem um ambiente para o isolamento de muitas espécies de microrganismos.

1.4.1.2. BIOHIDROGENIO

A demanda de bio-hidrogênio vem aumentado consideravelmente nos últimos anos, porque é considerada uma fonte de energia limpa, para utilizar como matéria prima na indústria. A produção biológica de este importante gás é promissoria e

apresenta vantagem em relação a outros tipos de processos de obtenção como a fotólise da água e processamentos térmicos que envolvem um elevado custo energético. Por isto é importante desenvolver novos processos biotecnológicos (KAPDAN e KARGI, 2006).

A interação de microrganismos isolados de fontes termais em presença dos açúcares dos hidrolisados do tronco da palma tem sido avaliados, mostrando resultados interessantes. Os consórcios microbianos PGR e YLT conformados por *Thermoanaerobacterium* sp., *Thermoanaerobacter* sp., *Caloramater* sp., e *Anoxybacillus* sp., apresentaram bons rendimentos na produção de biohidrogênio (241,4 e 231,6 mL H₂. g⁻¹ açúcar consumida); além de produzir ácido butírico, ácido acético, ácido láctico e butanol e de consumir mais do 90% dos açúcares (HNIMAN et al., 2011).

1.4.1.3. BIOGAS.

O biogás é uma mistura de gases formada por metano em uma concentração entre 50 a 70%, além, de dióxido de carbono, hidrogênio, nitrogênio, oxigênio, sulfeto de hidrogênio. Pode ser utilizado para produzir eletricidade gerar energia aos veículos, sendo considerado um combustível. É formado pela degradação anaeróbia da matéria orgânica por microrganismos nativos (KAPARAJU e FELBY, 2010).

O processo de formação de biogás consiste em manter uma relação C/N equilibrada; ou seja se aumentamos a relação C/N, a produção de proteínas pelos microrganismos poderia cair, mostrando baixos títulos de biogás; caso contrário, se aumentaria a produção de amoníaco, diminuiriam também nos títulos de biogás (DEUBLEIN e STEINHAUSER, 2008). A produção de biogás é caracterizada pelas variações de pH entre 4.8 e 5.7 nas etapas iniciais, podendo chegar ate 7,8 a 8,2 nas etapas finais tendo como consequência desse processo alcalino, a matéria orgânica é consumida e se produzem hidrólises, formando-se alguns ácidos que são consumidos e formando gás pela metanogênese (LYBERATOS e SKIADAS, 1999).

O uso de fibra prensada da palma (FPP) e os cachos vazios da palma (EFB) tem sido reportados como co-substratos e substratos na produção de biogás (Mata- Alvares et al., 2000; Menon et al., 2003). Na experiência de Bah et al. (2014) utilizando

FFP como co-substrato do esterco de bovinos, em uma proporção de 3:1, produzindo biogás e metano, obtendo rendimentos de 93,6 mL. g⁻¹ sólidos voláteis adicionados (SVa). Usando só FFP se obteve rendimentos de biogás diário de até (90,0 mL. g⁻¹ SVa), em comparação com o biogás produzido só de esterco de vaca o rendimento foi bem menor, 23,4 mL. g⁻¹ SVa. Segundo este autor esta diferença nas formações de biogás e metano pode ser pelo conteúdo residual dos óleos que ficam no FFP.

Na experiência de Saritpongteeraka et al. (2014), produziu-se biogás usando um reator batch de leito anaeróbio usando EFB e esterco de porco. As condições favoreceram a formação de ácidos orgânicos (propiónico, butírico e valérico) que ajudaram indiretamente na degradação da estrutura lignocelulolítica da biomassa dos EFB e conseqüentemente a formação de biogás, com o consumo destes ácidos orgânicos. A incorporação de POME junto aos EFB tem sido avaliada também, reduzindo o tempo de compostagem (Singh et al., 2010). Ultimamente Nurliyana et al. (2015), avaliou a co-fermentação de EFB e POME, chegando a produzir metano em um volume de 2,03 L usando uma relação C/N de 45 (76% w/w de POME e 24% w/w de EFB), chegando a conclusão que o rendimento usando dos EFB e POME é 12 vezes maior em comparação com o POME sozinho.

Por isto a co-digestão de EFB com POME tem um efeito positivo no tratamento da biomassa. Os EFB que oferecem matéria orgânica rica em carbono para a produção de metano, junto com o POME que é uma mistura de carboidratos, gorduras e proteínas que vem do processo de extração de óleo e contribui na elevada concentração de sólidos totais, fazendo que esta co-digestão anaeróbia seja ótima para a produção de biogás e metano.

1.4.2. Considerações finais.

A produção de óleo de palma no Brasil continuará em crescimento, com as perspectivas de fortalecer a matriz de bioenergética do biodiesel, por consequência a biomassa residual da palma estão se tornando muito atrativa de ser utilizada. Os EFB, FFP, POME, são matérias primas interessantes dos quais se podem obter novos insumos e produtos de valor agregado. Os biocombustíveis como o biogás e o

biohidrogênio continuam-se desenvolvendo, sendo a indústria do óleo de palma um dos principais fatores.

1.5. Referências.

ABE, A.; ODA, Y.; ASANO, K.; SONE, T. *Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers. **Mycologia**, v. 99, n. 5, p. 714–722, 2007.

AKSU, Z.; ÇALIK, A.; DURSUN, A. Y.; DEMIRCAN, Z. Biosorption of iron(III)-cyanide complex anions to *Rhizopus arrhizus*: Application of adsorption isotherms. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 483–491, 1999.

AKSU, Z.; TEZER, S. Equilibrium and kinetic modelling of biosorption of Remazol black B by *Rhizopus arrhizus* in a batch system: Effect of temperature. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 5, p. 431–439, 2000.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. N.; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*, John Willey & Sons Inc. *New York, USA Google Scholar*, 1996.

BAHARUDDIN, A. S.; ASMA, N.; RAZAK, A.; AINI, N.; RAHMAN, A. Biocoverison of Oil Palm Empty Fruit Bunch by *Aspergillus niger* EB4 under Solid-state Fermentation. , v. 32, n. December 2008, p. 143–151, 2009.

BAI, D. M.; JIA, M. Z.; ZHAO, X. M.; et al. L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. **Chemical Engineering Science**, v. 58, n. 3–6, p. 785–791, 2003.

BAH, HAMIDOU, et al. Evaluation of batch anaerobic co-digestion of palm pressed fiber and cattle manure under mesophilic conditions. *Waste management*, 2014, vol. 34, no 11, p. 1984-1991.

BAKAR, N. K. A.; ABD-AZIZ, S.; HASSAN, M. A.; GHAZALI, F. M. Isolation and selection of appropriate cellulolytic mixed microbial cultures for cellulases production from oil palm empty fruit bunch. **Biotechnology**, 2010.

BIODIESEL BRASIL - Biopalma inaugura primeira usina de extração de óleo de palma no Pará - 2014. Disponível em: Acesso em: 15 de Março, 2017, Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/materia-prima/dende/biopalma-inaugura-planta-producao-oleo-palma-para-260612.htm>>

BRANCO, R. F.; SANTOS, J. C.; MURAKAMI, L. Y.; et al. Xylitol production in a bubble column bioreactor: Influence of the aeration rate and immobilized system concentration. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 258–262, 2007.

BUTKEWITSCH W. and M. W. FEDEROFF, *Biochem. Z.*, **206**, 440; **207**, 302 (1929); **219**, 87, 103 (1930).

CAO, N.; DU, J.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. Simultaneous Production and Recovery of Fumaric Acid from Immobilized RO with RBC and Adsorption Column. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 2926–2931, 1996.

CARTA, F. S.; SOCCOL, C. R.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 1, p. 23–28, 1999.

CHEN, X.; DONG, X.; WANG, Y.; ZHAO, Z.; LIU, L. **Mitochondrial engineering of the TCA cycle for fumarate production**. Elsevier, 2015.

CORAL MEDINA, J. D.; WOICIECHOWSKI, A. L.; ZANDONA FILHO, A.; et al. Biological activities and thermal behavior of lignin from oil palm empty fruit bunches as potential source of chemicals of added value. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 630–637, 2016.

CORAL MEDINA, J. D.; WOICIECHOWSKI, A.; ZANDONA FILHO, A.; et al. Lignin preparation from oil palm empty fruit bunches by sequential acid/alkaline treatment - A biorefinery approach. **Bioresour Technol**, v. 194, p. 172–178, 2015.

CORLEY, R. HERWARD V.; TINKER, P. B. H. *The oil palm*. John Wiley & Sons, 2008.

CUESTA, G., et al. Isolation and identification of Actinomycetes from a compost- amended soil with potential as biocontrol agents. *Journal of Environmental Management*, vol. 95, p. S280-S284, 2012.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 3, p. 220–225, 1996.

DENG, Y.; LI, S.; XU, Q.; GAO, M.; HUANG, H. Production of fumaric acid by simultaneous saccharification and fermentation of starchy materials with 2- deoxyglucose-resistant mutant strains of *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 363–367, 2012.

DEUBLEINN D. and STEINHAUSER A. 2008. Biogas from waste and renewable resources. Weinheim: Willey-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA

DROUVOT, C. "O Programa Federal de Produção Sustentável de Óleo de Palma: a Questão da Participação dos Atores Locais em Favor do Desenvolvimento Territorial." *Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia*, 2012.

EPE [Empresa de Pesquisa Energética]. Plano Nacional de Energia 2030. Disponível em <http://www.epe.gov.br>. Rio de Janeiro/RJ. 2007.

EHRlich F., Ber., 44, 3737 (1911); 62, 63 (1919).

FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus* immobilized on polyurethane sponge. **Progress in Biotechnology**, v. 11, n. C, p. 655–660, 1996.

FELIPE, M. G., VIEIRA, D. C., VITOLO, M., SILVA, S. S., ROBERTO, I. C., & MANCHILHA, I. M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Journal of basic microbiology*, 35(3), 171-177, 1995.

FERREIRA, J. A.; LENNARTSSON, P. R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M. J. Zygomycetes-based biorefinery: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 523–532, 2013.

FEDERICI, F. Potential applications of viable, immobilized fungal cell systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(5), 495-502, 1993.

FEROLDI, M., CREMONEZ, P. A., e ESTEVAM, A. Dendê: do cultivo da palma à produção de biodiesel. *Monografias Ambientais*, 13(5), 3800-3808. 2014.

FONTANA, J. *Biodiesel: para leitores de 9 a 90 anos*. Ed. UFPR, 2011.

FOSTER, J. W.; WAKSMAN, S. A. The Production of Fumaric Acid by Molds Belonging to the Genus *Rhizopus*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 61, n. 1, p. 127–135, 1939.

GANGL, I. C.; WEIGAND, W. A.; KELLER, F. A. Economic comparison of calcium fumarate and sodium fumarate production by *Rhizopus arrhizus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24–25, n. 1, p. 663–677, 1990.

GANGL, I. C.; WEIGAND, W. A.; KELLER, F. A. Metabolic modeling of fumaric acid production by *rhizopus arrhizus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28–29, n. 1, p. 471–486, 1991.

GETHA, K.; VIKINESWARY, S. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, vol. 28, no 6, p. 303-310, 2002

GOLDBERG I, ROKEM JS, PINES O. Organic acids: old metabolites, new themes. *J Chem Technol Biotechnol*, 81(10):1601–11, 2006

GOMES, A. P.; PEREIRA, F. A. Mathematical modelling of a composting process, and validation with experimental data. **Waste Manag Res**, v. 26, n. 3, p. 276–287, 2008.

HNIMAN, A.; O-THONG, S.; PRASERTSAN, P. Developing a thermophilic hydrogen-producing microbial consortia from geothermal spring for efficient utilization of xylose and glucose mixed substrates and oil palm trunk hydrolysate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 14, p. 8785–8793, 2011.

HNIMAN, A, et al. Community analysis of thermophilic hydrogen-producing consortia enriched from Thailand hot spring with mixed xylose and glucose. *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 36, no 21, p. 14217-14226, 2011.

KAPDAN, ILGI KARAPINAR; KARGI, Fikret. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzyme and microbial technology*, vol. 38, no 5, p. 569-582, 2006.

KAPARAJU, P; FELBY, C. Characterization of lignin during oxidative and hydrothermal pre-treatment processes of wheat straw and corn stover. *Bioresource technology*, vol. 101, no 9, p. 3175-3181, 2010.

KAUTOLA, H.; LINKO, Y. Y. Fumaric acid production from xylose by immobilized *Rhizopus arrhizus* cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 5–6, p. 448–452, 1989.

KAUTOLA, H.; LINKO, Y. Y. Production of fumaric acid with immobilized biocatalysts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24–25, n. 1, p. 161–170, 1990.

KENEALY, W.; ZAADY, E.; DU PREEZ, J. C.; STIEGLITZ, B.; GOLDBERG, I. Biochemical Aspects of Fumaric Acid Accumulation by *Rhizopus arrhizus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 52, n. 1, p. 128–33, 1986.

KRISHNAN, YUVANESWARAN, et al. Co-composting of palm empty fruit bunch and palm oil mill effluent: Microbial diversity and potential mitigation of greenhouse gas emission. *Journal of Cleaner Production*, 2016.

KRIVOBOK, S.; MIRIOUCHKINE, E.; SEIGLE-MURANDI, F.; BENOIT-GUYOD, J. L. Biodegradation of anthracene by soil fungi. **Chemosphere**, v. 37, n. 3, p. 523–530, 1998.

LIAO, W.; LIU, Y.; FREAR, C.; CHEN, S. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus - *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 18, p. 3415–3423, 2007.

LENNARTSSON, Patrik. *Zygomycetes and cellulose residuals: hydrolysis, cultivation and applications*. University of Borås: School of Engineering; Chalmers University of Technology: Department of Chemical and Biological Engineering, 2012.

LYBERATOS, G.; SKIADAS, I. V. Modelling of anaerobic digestion—a review. *Global Nest Int J*, 1999, vol. 1, no 2, p. 63-76.

LIM, K. C., and CHAN K. W. "Towards optimizing empty fruit bunch application in oil palm." *1989 PORIM International Palm Oil Development Conference, Module II—Agriculture*. (Eds S Aalani, Z Zin Zawawi, K Paranjothy, D Ariffin, N Rajanaidu, S Cheah) pp. 1989.

NG TK, HESSER RJ, STIEGLITZ B, GRIFFITHS BS, LING LB. Production of tetrahydrofuran/1,4 butanediol by a combined biological and chemical process. *Biotech Bioeng Symp* 17:344–363. 1986.

MADAKI, Y. S.; SENG, L. Palm oil mill effluent (POME) from Malaysia palm oil mills: waste or resource. *International Journal of Science, Environment and Technology*, vol. 2, no 6, p. 1138-1155, 2013.

Malaysian Palm Oil Board (MPOB). *Malaysian Palm Oil Statistics 2013*. Malaysian Palm Oil Board, Ministry of Plantation Industries and Commodities, Malaysia, 2014.

MONICA S.S., TAIANA C., LUIZ A., MARCOS A., LEOCIR J.C., DERCIO C.P, HIGOR E.F.L. **Improving the nutrient content of sheep bedding compost by adding cattle manure** *J. Clean. Prod.*, 86 pp. 9–14, 2014.

MCCARTHY, A. J. Lignocellulose-degrading actinomycetes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 46, n. 2, p. 145–163, 1987.

MORESI, M.; PARENTE, E.; PETRUCCIOLI, M.; FEDERICI, F. Optimization of fumaric acid production from potato flour by *Rhizopus arrhizus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 35–39, 2004.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004.

NOOMTIM, P.; CHEIRSILP, B. Production of Butanol from Palm Empty Fruit Bunches Hydrolyzate by *Clostridium Acetobutylicum*. **Energy Procedia**, v. 9, p. 140–146, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2011.09.015>>. .

NURLIYANA, M. Y.; H'NG, P. S.; RASMINA, H.; et al. Effect of C/N ratio in methane

productivity and biodegradability during facultative co-digestion of palm oil mill effluent and empty fruit bunch. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 409–415, 2015.

MATA-ALVAREZ, Joan; MACE, S.; LLABRES, P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource technology*, vol. 74, no 1, p. 3-16, 2000.

MIALL, L. M. Economic Microbiology, Primary Products of Metabolism, vol. 2, Rose, A. H., ed., Academic, New York, pp. 87-90, 1978.

MENON, N. Ravi; RAHMAN, Z. Abdul; BAKAR, Nasrin Abu. Empty fruit bunches evaluation: Mulch in plantation vs. fuel for electricity generation. *Oil palm industry economic journal*, vol. 3, no 2, p. 15-20, 2003.

OSMANI, S. .; SCRUTTON, M. . The sub-cellular localization and regulatory properties of pyruvate carboxylase from *Rhizopus arrhizus*. **European Journal Biochemistry**, v. 147, p. 119–128, 1985.

OVERMAN, S. A; ROMANO, A H. Pyruvate carboxylase of *Rhizopus nigricans* and its role in fumaric acid production. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 37, n. 3, p. 457–463, 1969.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.

PATIL, Hemant J., et al. Selective isolation, evaluation and characterization of

antagonistic actinomycetes against *Rhizoctonia solani*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 26, no 12, p. 2163-2170, 2010.

PELEG, Y.; BATTAT, E.; SCRUTTON, M. C.; GOLDBERG, I. Isoenzyme pattern and subcellular localisation of enzymes involved in fumaric acid accumulation by *Rhizopus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 32, n. 3, p. 334–339, 1989.

Projeto Potencialidades Regionais – Estudo de Viabilidade Econômica da Dendê – Fundação Getúlio Vargas e SUFRAMA/2003 – disponível em: <www.suframa.gov.br>

RAMALHO F., ANTONIO, et al. Zoneamento agroecológico do dendê nas áreas desmatadas da amazônia legal. *EMBRAPA, Rio de Janeiro*, 2010. Research Reports 2016. Global Organic Acid Market Analysis & Opportunity Outlook 2021. Disponível em: <http://www.researchnester.com/reports/global-organic-acid-market-analysis-opportunity-outlook-2021/81>

ROA ENGEL, C. A.; STRAATHOF, A. J. J.; ZIJLMANS, T. W.; VAN GULIK, W. M.; VAN DER WIELEN, L. A. M. Fumaric acid production by fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 78, n. 3, p. 379–389, 2008.

ROMANO, A. H.; BRIGHT, M. M.; SCOTT, W. E.; SCOYTL, W. E. Mechanism of Fumaric Acid Accumulation in *Rhizopus nigricans* Mechanism of Fumaric Acid Accumulation in *Rhizopus nigricans*. *Journal of bacteriology*, v. 93, n. 2, p. 600–604, 1967.

RHODES, R. A; MOYER, A J.; SMITH, M. L.; KELLEY, S. E. Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus*. *Applied microbiology*, v. 7, n. 2, p. 74–80, 1959.

SAHA, B. C. Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry*, v. 39, n. 12, p. 1871– 1876, 2004.

SALICIS, F.; KRIVOBOK, S.; JACK, M.; BENOIT-GUYOD, J. L. Biodegradation of fluoranthene by soil fungi. **Chemosphere**, v. 38, n. 13, p. 3031–3039, 1999.

SARITPONGTEERAKA, Kanyarat, et al. Co-fermentation of oil palm lignocellulosic residue with pig manure in anaerobic leach bed reactor for fatty acid production. *Energy Conversion and Management*, vol. 84, p. 354-362, 2014.

SIM, Edwin Yih Shyang; WU, Ta Yeong. The potential reuse of biodegradable municipal solid wastes (MSW) as feedstocks in vermicomposting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 90, no 13, p. 2153-2162, 2010.

SINGH, R. P., et al. Composting of waste from palm oil mill: a sustainable waste management practice. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 9, no 4, p. 331-344, 2010.

SHINOJ, S., et al. Oil palm fiber (OPF) and its composites: A review. *Industrial Crops and Products*, 2011, vol. 33, no 1, p. 7-22.

STICHNOTHE, H.; SCHUCHARDT, F. Life cycle assessment of two palm oil production systems. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 9, p. 3976–3984, 2011.

TANG, J. C.; KANAMORI, T.; INOUE, Y.; et al. Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1999–2006, 2004.

TAN, L.; YU, Y.; LI, X.; et al. Pretreatment of empty fruit bunch from oil palm for fuel ethanol production and proposed biorefinery process. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 275–282, 2013.

TAKAHASHI, T., and ASAI, T., "Acids Formed by Species of *Rhizopus*," Proc. Imp. Acad. Sci., Japan, 3, 86-89, 1927.

THAMBIRAJAH, J. J.; ZULKALI, M. D.; HASHIM, M. A. Microbiological and biochemical changes during the composting of oil palm empty-fruit-bunches. Effect of nitrogen supplementation on the substrate. *Bioresource technology*, 1995, vol. 52, no 2, p. 133-144.

TING, A. S. Y.; TAY, H.; PEH, K. L.; TAN, W. S.; TEE, C. S. Novel isolation of thermophilic *Ureibacillus terrenus* from compost of empty fruit bunches (EFB) of oil palm and its enzymatic activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 162–164, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2012.11.004>> .

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITÄVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review. **Bioresource Technology**, v. 72, n. 2, p. 169–183, 2000.

WANG, G.; HUANG, D.; LI, Y.; WEN, J.; JIA, X. A metabolic-based approach to improve xylose utilization for fumaric acid production from acid pretreated wheat bran by *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 119–127, 2015.

WANG, G.; HUANG, D.; QI, H.; et al. Rational medium optimization based on comparative metabolic profiling analysis to improve fumaric acid production. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 1–8, 2013.

XU, Q.; LI, S.; FU, Y.; TAI, C.; HUANG, H. Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6262–6264, 2010.

VENTURIERI, A.; FERNANDES, W. R.; BOARI, A. D. J. RELAÇÃO ENTRE OCORRÊNCIA DO AMARELECIMENTO FATAL DO DENDEZEIRO (*Elaeis guineensis* Jacq.) E VARIÁVEIS AMBIENTAIS NO ESTADO DO PARÁ. **Anais XIV Simp Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, , n. Abril, p. 523–530, 2009.

YANG, S. T.; ZHANG, K.; ZHANG, B.; HUANG, H. **Fumaric Acid**. Second Edition. Elsevier B.V., 2011.

YING, T. Y.; TEONG, L. K.; ABDULLAH, W. N. W.; PENG, L. C. The Effect of Various Pretreatment Methods on Oil Palm Empty Fruit Bunch (EFB) and Kenaf Core Fibers for Sugar Production. **Procedia Environmental Sciences**, v. 20, p. 328–335, 2014.

ZAINUDIN, M. H. M.; HASSAN, M. A.; TOKURA, M.; SHIRAI, Y. Indigenous cellulolytic and hemicellulolytic bacteria enhanced rapid co-composting of lignocellulose oil palm empty fruit bunch with palm oil mill effluent anaerobic sludge. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 632–635, 2013.

ZAINUDIN, Mohd Huzairi Mohd, et al. Bacterial community structure and biochemical changes associated with composting of lignocellulosic oil palm empty fruit bunch. *BioResources*, 2013, vol. 9, no 1, p. 316-335.

ZHANG, B.; SKORY, C. D.; YANG, S. T. Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae*: Effects of overexpressing *pyc* and *pepc* genes on fumaric acid biosynthesis from glucose. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 5, p. 512–520, 2012.

ZHOU, Z.; DU, G.; HUA, Z.; ZHOU, J.; CHEN, J. Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9345–9349, 2011.

2. CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO DOS CACHOS VAZIOS DA PALMA (EFB).

Resumo.

Os cachos vazios dos frutos da palma (EFB) são uma biomassa vegetal, com elevada concentração de polissacarídeos. A celulose constitui a maior fração entre 30 a 40%, seguida da hemicelulose entre 20 a 25% e a lignina entre 20 a 35%, por isto a metade da massa dos EFB são açúcares. A hidrólise ácida a elevadas temperaturas facilita que a fração da hemicelulose se desprenda e se libere, oferecendo um substrato rico em pentoses. Neste trabalho usando o HPLC, determinou-se que os hidrolisados ácidos dos EFB contêm concentrações elevadas de xilose ($19,82 \text{ g.L}^{-1}$) e arabinose ($2,57 \text{ g.L}^{-1}$) e em menor concentração glicose ($0,27 \text{ g.L}^{-1}$). A presença de ácido acético se explica pela auto hidrólise da hemicelulose acetilada, e o furfural e o hidroximetilfurfural pela degradação dos açúcares entre pentoses e hexoses. Detectou-se a presença novos compostos no hidrolisado usando o detector UV a 208nm de comprimento de onda e usando o espectro UV-vis, mediante um análise de varredura determinou-se que existem grupos com atividade a luz UV em comprimentos de onda entre 200 até 340nm.

Palavras chave: cachos vazios da palma; xilose; HPLC; espectro UV-VIS; hidrólise ácida.

2.1. Introdução.

Os cachos vazios da palma são considerados como um resíduo da moenda do fruto da palma oleaginosa "*Elaeis guineensis*". O cultivo desta planta precisa de condições climáticas adequadas, por isso os trópicos húmidos favorecem seu crescimento (ZEVEN, 1964). O óleo contido nestes frutos é utilizado na produção de biodiesel por países como Malásia e Indonésia, que são os maiores produtores a nível mundial (CHUA, 2010; WU et al., 2010). A produção de óleo de palma é tão grande que em 2013, Malásia destinou 15% de terra ao cultivo de palma obtendo 19 milhões de

toneladas de óleo de palma liberando 83 milhões de toneladas de biomassa (MPOB, 2014).

O Brasil, além de ser uma potencia energética, é um dos principais produtores de óleo de palma. Atualmente é o terceiro país da América do Sul que produz óleo da palma, depois da Colômbia e do Equador, e a nível mundial é considerado o 10° produtor (TRADEMAP, 2013). Brasil conta com terras adequadas no norte e no nordeste do país que são interessantes desde o ponto de vista climático por favorecer no ano todo as condições para que as plantações de *Elaeis guineenses* sejam favorecidas. Segundo CORAL et al. (2015) foram instaladas 13 plantas piloto para o processamento do óleo da palma, tendo uma projeção da produção de 751 milhões de óleo por ano.

Devido à alta demanda que tem o óleo da palma na utilização em biocombustíveis, grandes áreas de cultivo são utilizadas e são gerados grandes quantidades de resíduos, causando problemas de contaminação ambientais. A queima de troncos, galhos, cascas dos frutos, a eliminação dos efluentes em vertedouros, tem sido reportados, causando na população afeções de saúde (TING et al., 2013). Foi reportado que para cada tonelada de frutos de palma processadas são produzidos 200,0kg de óleo de palma, 220,0kg de EFB, 135,0kg de fibra prensada da palma (FFP), e mais de 600,0kg de efluentes líquidos saídos da moenda (CORLEY e TINKER, 2008; SHINOJ et al., 2011; STICHNOTHE e SCHUCHARDT 2011). Tem-se projetado para 2020 uma produção de 85 até 110 milhões de toneladas de biomassa de palma (MPOB, 2014).

A utilização dos cachos vazios da palma tem sido reportada na fabricação de compostagem e produção de biogás (MATA- ALVARES et al., 2000; MENON et al., 2003; MADAKI e SENG, 2013). Embora pesquisas indicam que os EFB são uma matéria prima importante, pois é composta por celulose (glucano), hemicelulose (xilano e arabinano) e lignina (NOOMTIM e CHEIRSILP, 2011). Os processos de hidrolises ácida liberam açúcares contidos na matriz lignocelulósica. Usando estes pre- tratamentos são reportados elevados teores de xilose a partir dos cachos vazios da palma (NOOMTIM e CHEIRSILP, 2011; SOBRAL, 2016). Por isto o uso biotecnológico

destes hidrolisados ajudaria a diminuir o nível de poluição causado pela indústria do óleo da palma.

Objetivos

- ✓ Determinar as características do hidrolisado dos cachos vazios, na fração de 0,35-0,42 mm de diâmetro, ao análise de varredura no espectro UV-VIS no comprimento de onda de 200 até 800nm.
- ✓ Determinar a composição do hidrolisado dos cachos vazios da palma, após do pré tratamento ácido da fração de 0,35 até 0,42 mm de diâmetro da biomassa, no HPLC.
- ✓ Determinar o valor de biomassa removida total e da hemicelulose.
- ✓ Detectar e reportar a presença de grupos cromóforos na região do UV-VIS no hidrolisado do EFB da fração 0,34 a 0,42 mm de diâmetro de partícula.

2.2. Material e metodologia

2.2.1. Biomassa vegetal

Os cachos vazios dos frutos da palma (EFB) foram obtidos da fabrica de Palma da empresa Vale localizada em Mojú, estado de Pará, Brasil. Foram moídos e peneirados. Utilizou-se a fração da biomassa compreendida entre 0,35 a 0,42 mm de diâmetro (MEDINA et al., 2016), seguida de uma secagem a 80°C por 24 horas.

2.2.2. Hidrolise ácida

Utilizou-se 10 gramas de EFB (0.35-0.45 mm) e misturados com 100 ml de uma solução de ácido sulfúrico de 1,5%, posteriormente foi hidrolisado em autoclave a uma temperatura de 130°C por 15 minutos (SOBRAL, 2016). No final da hidrolise o material foi filtrado e o liquido foi ajustado a um pH de 4.0 usando NaOH (4M) (WANG et al., 2015), após da neutralização, o líquido foi filtrado usando papel filtro qualitativo de 12µm e armazenado a 4°C na geladeira.

2.2.3. Análise do hidrolisado por espectroscopia no ultravioleta visível

Detectaram-se os sinais de compostos presentes dos grupos cromóforos no hidrolisado usando um análise de varredura no espectro UV-VIS em uma faixa de 200 até 800 nm no comprimento de onda. A identificação dos sinais permitiu focar os análises no HPLC, com o comprimento de onda adequado. Para isso se fez uma diluição 1:100 do hidrolisado dos EFB com água deionizada e colocada em cubeta de quartzo para a avaliação no espectroscópio UV-VIS, com uma resolução de 2nm.

2.2.4. Determinação de açúcares e subprodutos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A concentração dos açúcares do hidrolisado foram determinados por HPLC (1200, Agilent Technologies, USA) com uma coluna animex HPX-87H (300 x 7.8mm, Bio-Rad, USA) usando um detector de índice de refração (IR) (Agilent, HP1047A). Para a detecção de Hidroximetilfurfural e Furfural foi usado um detector de absorvância ultravioleta (UV) (Agilent, G1315D) a 280 nm (furfural e hidroximetilfurfural). O comprimento de onda foi escolhido pelos sinais apresentados no análise de varredura e pela maior sensibilidade a esses comprimentos de onda por estes componentes. A coluna foi mantida a 65 °C, com um fluxo de 0.6 mL.min⁻¹ de uma fase móvel de H₂SO₄ ao 5 mM. A Os tempos de retenção dos componentes do hidrolisado são apresentados na tabela 2-1. Os experimentos foram feitos por quintuplicata (Tabela 2-3).

Tabela 2-1. Tempos de retenção do hidrolisado no HPLC.

Componentes do Hidrolisado	Tempo de retenção (minutos)
	IR
Glucose	10.40
Xilose	10.80
Arabinose	11.80
Ácido acético	17.00

2.3. Resultados e discussão.

2.3.1. Espectro UV-vis do hidrolisado.

O resultado do análises de varredura no espectro UV-vis é apresentada na Figura 2-1. Os sinais correspondem ao espectro UV (200nm e 278 nm) diminuindo sua intensidade a partir de 350nm até 400nm.

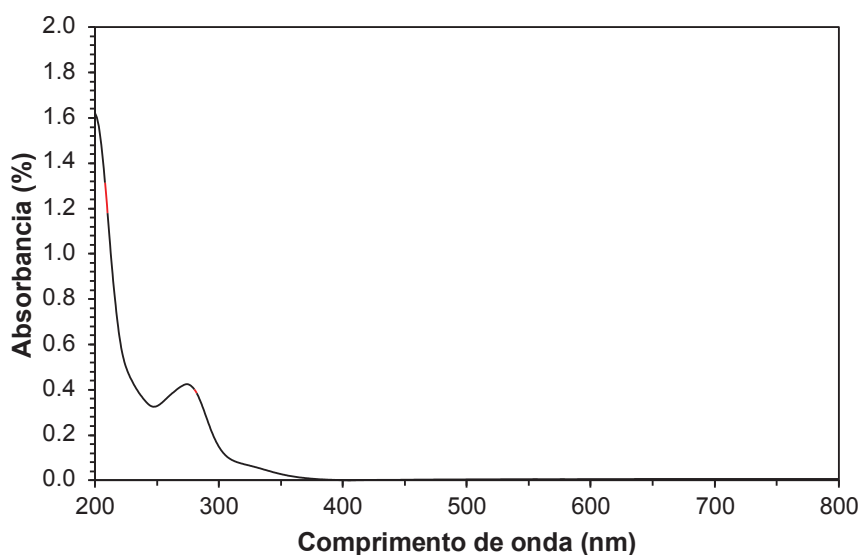


Figura 2-1. Análise de varredura de uma amostra do hidrolisado no espectro UV-VIS no comprimento de onda de 200 até 800nm.

Este espectro é característico de moléculas com grupos cromóforos que reagem a luz UV como os anéis aromáticos presentes nos grupos fenólicos da lignina. MARABEZI et al., 2009, determinou em bagaço de cana de açúcar a presença de sinais no espectro UV-VIS, que correspondem a 280 nm de comprimento de onda aos furfurais e ao HMF, moléculas oriundas da degradação da xilose e glicose e a região com comprimento de onda compreendida entre 200 até 230 nm de comprimento de onda indicando a presença de grupos fenólicos não condensados presentes na estrutura da lignina (FENGEL; WEGENER, 1984). Sobral, (2016); indica que após do pré-tratamento ácido da biomassa dos cachos vazios da palma na faixa de 0,35-0,42 mm, se obtém entre 1 e 10% de lignina solúvel. MARABEZI, (2009), indica também que dependendo do tipo de resíduo, as modificações do processo ou a utilização de ácidos ou bases, diferentes moléculas serão produzidas.

2.3.2. Açúcares contidos no hidrolisado.

A composição do hidrolisado dos EFB comparada com os resultados feitos por SOBRAL, (2016), são apresentados na Figura 2-2. A xilose é o componente em maior concentração (19,82 g.L⁻¹), seguida pela arabinose (2,57 g.L⁻¹). A quantidade de açúcares totais detectados é 23,32 g.L⁻¹. O pré-tratamento ácido e térmico, somado a que a biomassa é acetilada resulta em elevadas concentrações de ácido acético. Os componentes, HMF e o Furfurais são encontrados em baixas concentrações, o que correspondem a uma baixa degradação dos açúcares.

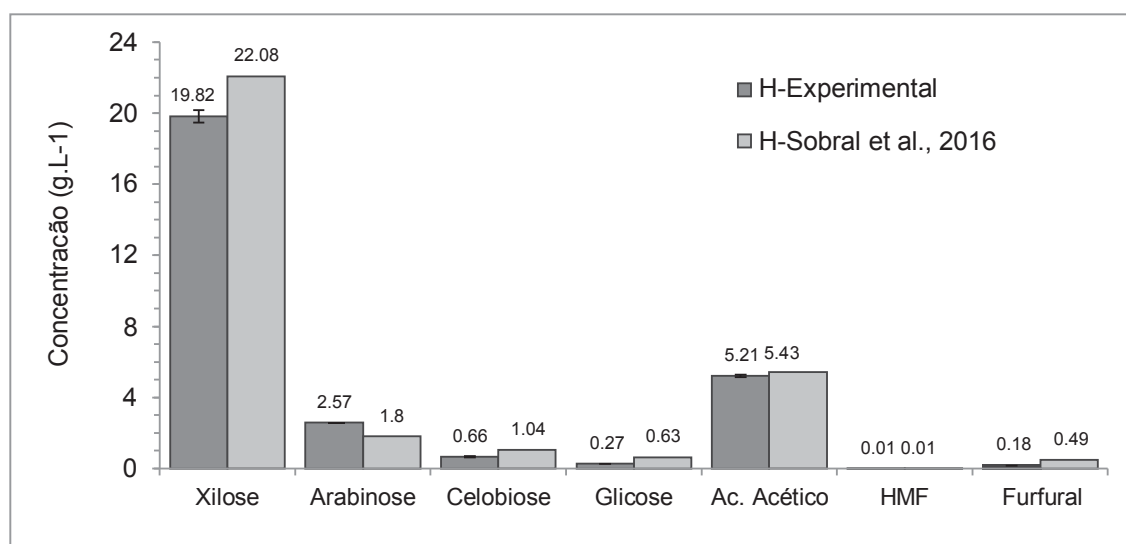


Figura 2-2. Comparação dos componentes do hidrolisado dos EFB.

Uma vantagem do uso da hidrólise com ácido sulfúrico diluído é que é adequado por ter baixa corrosividade frente às fibras vegetais (GRAY et al., 2006). O mecanismo de liberação de açúcares ocorre quando o ácido sulfúrico rompe as ligações glicosídicas das cadeias da hemicelulose e as ligações éter da lignina, liberando as pentoses principalmente; o ácido acético é formado a partir dos resíduos acetilados da hemicelulose. Segundo NOOMTIM et al. (2011), usando uma solução 1,5% de H₂SO₄, no tratamento ácido, recuperou 99% de xilose; além disso SOBRAL, 2016 obteve 22 g.L⁻¹ de xilose, usando a mesma metodologia usado neste experimento. Por tanto, conseguimos reproduzir este experimento com sucesso, sendo 90 % o rendimento de xilose em relação ao obtido por SOBRAL, 2016.

A recuperação das pentoses da hemicelulose da biomassa dos EFB na hidrólise é apresentado na Tabela 2-2. A massa seca dos EFB sofreu uma diminuição em peso seco após da hidrólise, que representa um 33,32% menos que a biomassa inicial. Evidentemente a fração das cadeias de hemicelulose e outras moléculas são liberadas ou transformadas. A soma de todos os componentes conhecidos no hidrolisado é de 28,72 g.L⁻¹; alias, existem outras moléculas (Figura 2-3) que estão presentes mas são desconhecidas.

Tabela 2-2. Recuperação das pentoses da hemicelulose da biomassa dos EFB na hidrólise.

W(EFB-1)g.L⁻¹	W(EFB -2) g.L⁻¹	W(EFB-3) g.L⁻¹	Biomassa total Removida (%)	Hemicelulose Removida (%)
10,03±0,02	6,85±0,10	3,34±0,08	33,32	22,39

W(EFB-1) g.L⁻¹: Biomassa seca dos EFB antes da hidrolise ácida.

W(EFB -2) g.L⁻¹: Biomassa seca dos EFB depois da hidrolise ácida.

W(EFB-3) g.L⁻¹: Biomassa seca consumido na hidrolise ácida.

Os resultados do análise do hidrolisado no detector UV do HPLC, são apresentados na Figura 2-3. Foram detectados nove componentes usando um comprimento de onda de 208 nm, sendo a mais intensa a primeira com uma absorbância de 1.42 AU x 100. O ataque ácido afetara a toda a fibra vegetal, depois da hemicelulose ser degradado, a fração lignocelulósica é exposta e possivelmente algumas moléculas são liberadas entre elas, celobiose, glicose e lignina solúvel. Algumas destas moléculas livres seriam ativas frente à luz UV, possivelmente porque contém dupla ligação, grupos carboxila ou grupos fenólicos. A identificação destes sinais é complicada, pois substancias padrões são necessárias para que possam confirmar a natureza química.

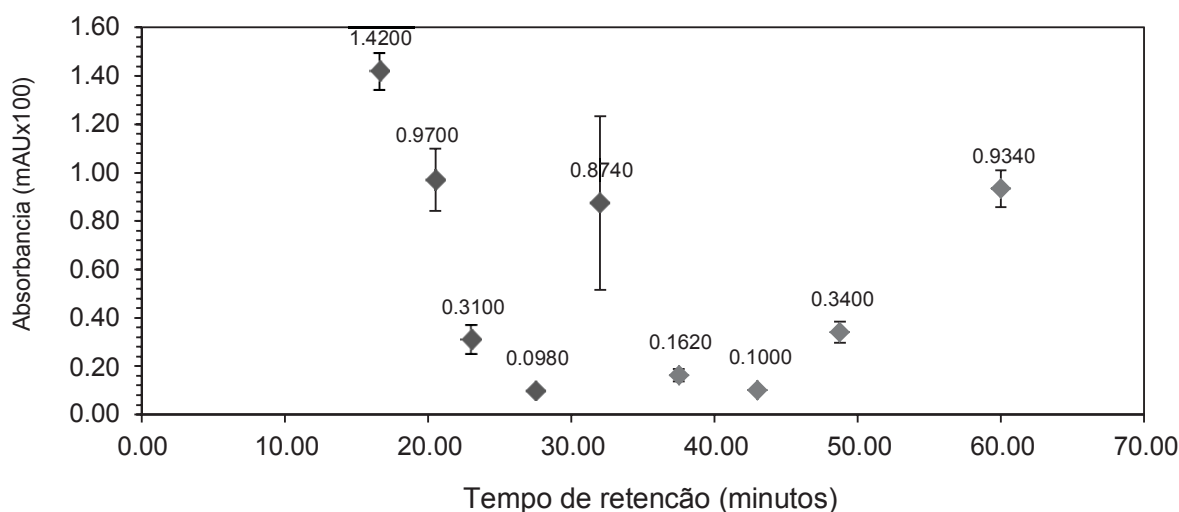


Figura 2-3. Sinais detectados no espectro de luz ultravioleta (UV) com um comprimento de onda de 208nm.

2.4. Conclusões.

- ✓ Determinou-se que o hidrolisado dos cachos vazios da palma, na fração 0,35- 0,42 mm, diluído 1:100, tem duas agrupações de sinais na faixa de comprimento de onda de 280 nm e 200 nm, de luz UV.
- ✓ Determinou-se que o hidrolisado dos cachos vazios da palma, na faixa de 0,35- 0,42mm, contém Xilose ($19,82 \text{ g.L}^{-1}$), Arabinose ($2,57 \text{ g.L}^{-1}$), Celobiose ($0,66 \text{ g.L}^{-1}$), Glicose ($0,27 \text{ g.L}^{-1}$), ácido acético ($5,21 \text{ g.L}^{-1}$), Furfurais ($0,18 \text{ g.L}^{-1}$), Hidroximetilfurfural ($0,01 \text{ g.L}^{-1}$).
- ✓ Determinou-se que a biomassa total removida após do pré tratamento ácido foi de 33,34%, sendo a hemicelulose o 22,39%.
- ✓ Determinou-se que existem nove componentes no HPLC usando o detector UV a 208 nm de comprimento de onda, não identificadas que podem interagir positivas o negativamente nos processos biológicos.

2.5. Referências.

CORLEY, R. HERWARD V.; TINKER, P. B. H. *The oil palm*. John Wiley & Sons, 2008.

CORAL MEDINA, J. D.; WOICIECHOWSKI, A.; ZANDONA FILHO, A.; et al. Lignin preparation from oil palm empty fruit bunches by sequential acid/alkaline treatment - A biorefinery approach. **Bioresour Technol**, v. 194, p. 172–178, 2015.

Chua, S. C., e Oh, T. H.. Review on Malaysia's national energy developments: Key policies, agencies, programmes and international involvements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(9), 2916-2925. 2010

GRAY, K. A., ZHAO, L., e EMPTAGE, M. CURR. *Opinion Chem. Biol.* 10, 141-146, 2006

FENGEL, D; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. *Walter de Gruyter*, vol. 613, p. 1960-82, 1984.

MARABEZI, K. *Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar*. 2009. Tesis Doctoral. Universidade de São Paulo.

NOOMTIM, P.; CHEIRSILP, B. Production of Butanol from Palm Empty Fruit Bunches Hydrolyzate by *Clostridium Acetobutylicum*. **Energy Procedia**, v. 9, p. 140–146, 2011.

Malaysian Palm Oil Board (MPOB). *Malaysiam Palm Oil Statistics 2013*. Malaysiam Palm Oil Board, Ministry of Plantation Industries and Commodities, Malaysiam. 2014.

MATA-ALVAREZ, J., MACE, S., e LLABRES, P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource technology*, vol. 74, no 1, p. 3-16, 2000

MADAKI, Y. S.; SENG, L. Palm oil mill effluent (POME) from Malaysia palm oil mills: waste or resource. *International Journal of Science, Environment and Technology*, vol. 2, no 6, p. 1138-1155, 2013.

MEDINA D. Evaluation of the production of Biofuels and chemicals from oil empty fruit bunches (OPEFB): A biorefinery approach. Tese de doutorado. 2016.

MENON, N. Ravi; RAHMAN, Z. Abdul; BAKAR, Nasrin Abu. Empty fruit bunches evaluation: Mulch in plantation vs. fuel for electricity generation. *Oil palm industry economic journal*, vol. 3, no 2, p. 15-20, 2003.

N RAVI, M.; ZULKIKLI, A. R.; NASRIN, A. B. Empty fruit bunches evaluation: Mulch in plantation vs fuel for electicity generaion. *Palmas (Colombia)*, 2004.

Sítio web <http://www.trademap.org/Index.aspx>>, consultado 16 de Março de 2017.

TING, A. S. Y.; TAY, H.; PEH, K. L.; TAN, W. S.; TEE, C. S. Novel isolation of thermophilic *Ureibacillus terrenus* from compost of empty fruit bunches (EFB) of oil palm and its enzymatic activities. ***Biocatalysis and Agricultural Biotechnology***, v. 2, n. 2, p. 162–164, 2013.

SHINOJ, S., et al. Oil palm fiber (OPF) and its composites: A review. *Industrial Crops and Products*, 2011, vol. 33, no 1, p. 7-22.

SOBRAL K. Estudos do pré-tratamento termo-químico dos resíduos lignocelulósicos do processamento da palma oleaginosa (*Elaeis guineensis*): Recuperação e fermentação alcoólica dos açúcares da fração hemicelulósica. Tese de doutorado, 2016.

STICHNOTHE, H.; SCHUCHARDT, F. Life cycle assessment of two palm oil production systems. ***Biomass and Bioenergy***, v. 35, n. 9, p. 3976–3984, 2011.

WU, T. Y., MOHAMMAD, A. W., JAHIM, J. M., e ANUAR, N. Pollution control technologies for the treatment of palm oil mill effluent (POME) through end-of-pipe processes. *Journal of Environmental Management*, 91(7), 1467-1490, 2010.

ZEVEN, A. C. On the origin of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Grana*, vol. 5, no 1, p. 121-123, 1964.

ANEXO

Na tabela 2-3, são apresentadas as absorvâncias por quintuplicata das sinais no detector UV A 208 nm de comprimento de onda do HPLC. Na figura 2-3, estes dados são graficados.

Tabela 2-3. Análise de sinais do hidrolisado no detector UV a 208nm

Tempos de retenção (minutos)	H-44-R1	H-44-R2	H-44-R3	H-44-R4	H-44-R5	Média	DP
16.58	1,20	1,60	1,40	1,50	1,40	1,4200	0,0742
20.50	0,60	1,30	0,90	1,10	0,95	0,9700	0,1294
23.00	0,30	0,50	0,20	0,30	0,25	0,3100	0,0570
27.50	0,10	0,10	0,10	0,10	0,09	0,0980	0,0022
32.00	1,50	0,10	1,50	1,17	0,10	0,8740	0,3596
37.50	0,20	0,10	0,20	0,20	0,11	0,1620	0,0261
43.00	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,1000	0,0000
48.75	0,30	0,50	0,30	0,30	0,30	0,3400	0,0447
60.00	0,90	1,20	0,85	0,90	0,82	0,9340	0,0763

3. POTENCIAL DO HIDROLISADO DOS CACHOS VAZIOS DE *Elaeis guineensis* NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO FUMÁRICO, USANDO *Rhizopus*.

Resumo

O ácido fumárico é obtido principalmente a partir de reações de redução do anidrido maléico a partir de substratos derivados do petróleo. Devido à que os mercados europeu e americano restringem produtos que contenham resíduos de catalizadores, a ideia de utilizar fontes renováveis como substituto do petróleo, para a produção de ácidos orgânicos por fermentação microbiana, é atrativa. *R. delemar* 32612 e *R. oryzae* 28618, foram testados com três fontes nitrogenadas para a obtenção de ácidos orgânicos. Detectou-se ácido fumárico usando as três fontes nitrogenadas; embora, determinou-se que a peptona de soja foi à fonte nitrogenada que estimulou a formação do pellet nos dois fungos, o sulfato de amônio estimulou à formação de micélio difuso e a ureia a formação de biofilme aderido na superfície do frasco erlenmeyer. Determinou-se também que existe diferença significativa na produção de ácido fumárico ao usar peptona de soja e sulfato de amônia em relação à ureia. Verificou-se que ao aumentar a concentração da fonte nitrogenada, estimula a formação de biomassa diminuindo a produção do ácido fumárico.

Palavras chave: *Rhizopus*, ácido fumárico, esporos, arroz.

3.1. Introdução.

Atualmente com o aumento do preço do petróleo a síntese química do ácido fumárico não é muito viável economicamente, por isso nos últimos anos alguns microrganismos têm sido avaliados para a produção de ácido fumárico. As espécies de *Rhizopus* podem usar como fonte de carbono, açúcares como a glicose e a xilose. A glicose é utilizada principalmente para a produção de ácido fumárico por sua facilidade de ser metabolizada na glicólise. A biossíntese de ácido fumárico acontece no ciclo de

Krebs, por reações de oxidação do ácido cítrico. Aliás, a síntese de oxalacetato por condensação de uma molécula de CO₂ com o piruvato favorece a biossíntese de ácido fumárico no citosol (WANG et al 2015). As espécies de *Rhizopus* com melhores rendimentos de ácido fumárico são *R. nigricans*, *R. arrhizus*, *R. oryzae*, *R. formosa* e *R. delemar* (FOSTER e WAKSMAN 1938; ABE et al., 2007).

Os resíduos vegetais são uma fonte de açúcares que podem ser usados na produção de ácido fumárico. No trabalho de CARTA et al. (1999) usando uma hidrólise enzimática da glicose na palha de mandioca obteve 2,76 g.L⁻¹ de ácido fumárico e depois de um processo de otimização obteve 21,28 g.L⁻¹. Também a experiência relatada por WANG et al. (2015), os hidrolisados do farelo de trigo continham uma concentração de xilose e glicose de 38 g.L⁻¹ e 4,8g.L⁻¹ respectivamente, obtendo uma concentração de 5,0 g.L⁻¹ de ácido fumárico e após de um processo de otimização conseguiu obter 20,2 g.L⁻¹.

Uma das problemáticas constatadas por alguns pesquisadores é a formação e o tamanho do pellet na fermentação. As diferentes morfologias que podem se formar, estão relacionadas ao estresse que são submetidas no meio de cultura (TENG et al., 2009).

Podem se formar grumos, pellets e micélio suspenso (ZHENGXIONG et al., 2011). A melhor forma de *Rhizopus* para a produção de ácido fumárico é o pellet, (LIAO et al., 2007). A presença de íons inorgânicos tem um efeito negativo na formação do pellet e positiva na acumulação da biomassa (ZHENGXIONG et al., 2011).

Na procura de novas fontes de carbono renovável e que não gere competição com os cultivos vegetais orientados para alimentação, a palma é uma boa alternativa para a produção de ácido fumárico. Além disso, não existem informações deste enfoque na literatura científica, sendo um campo não explorado e com muita projeção.

Objetivos.

- ✓ Determinar se o hidrolisado dos cachos vazios da palma estimulam a biossíntese de ácido fumárico por *Rhizopus*.

- ✓ Determinar o tipo de fonte nitrogenada que estimula a formação de pellet em *Rhizopus*.
- ✓ Determinar a melhor fonte nitrogenada para a produção de ácido fumárico por *Rhizopus*.
- ✓ Determinar se existe relação entre o aumento da concentração da fonte nitrogenada com o consumo de açúcares do hidrolisado e a produção de ácido fumárico.

3.2. Material e metodologia.

3.2.1. Biomassa vegetal.

Os cachos vazios dos frutos da palma (EFB) foram obtidos da fábrica de Palma da empresa Vale localizada em Mojú, estado de Pará, Brasil. Foram moídos e peneirados. Utilizou-se a fração da biomassa compreendida entre 0,35 a 0,42 mm de diâmetro (MEDINA et al., 2016), seguida de uma secagem a 80°C por 24 horas.

3.2.2. Hidrolise ácida.

Foram utilizados 10 gramas de EFB (0.35-0.45 mm) e misturados com 100 ml de uma solução de ácido sulfúrico de 1,5%, posteriormente foi hidrolisado na autoclave a uma temperatura de 130°C por 15 minutos (SOBRAL, 2016). No final da hidrólise o material foi filtrado e o líquido foi ajustado a um pH de 4,0 usando NaOH (4M) (WANG et al., 2015), após da neutralização, o líquido foi filtrado usando papel filtro qualitativo de 12 µm e armazenado a 4°C na geladeira.

3.2.3. Produção de esporos.

A propagação dos esporos foi avaliada no médio contendo só arroz. Tomou-se 60 gramas de arroz parabolizado “Tio João”, lavou-se com água e posteriormente foi aquecida por 20 minutos, a água descartou-se e foi utilizado 50 gramas de arroz e depositada em matraz erlemeyer de 500 mL; os esporos formados foram lavados com 50 mL de água destilada estéril e tween 80 (0,5%). A contagem dos esporos foi feita

usando uma câmara de Neubauer ($0,0025 \text{ mm}^2$) usando um microscópio ótico a 40X da marca “*OLYMPUS CX41*” (MADIGAM et al., 2008).

3.2.4. Meios de fermentação.

Prepararam-se quatro meios de cultivo, cuja composição é descrita na tabela 3-1. O pH de todos os meios foram ajustados até 7,00 usando NaOH (4M), posteriormente foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos a 1 atmosfera de pressão. Os esporos de *R. delemar* 34612 e *R. oligosporium* 28168, foram adicionados a cada erlenmeyer ($1,15 \times 10^7$ e $1,73 \times 10^7$ esporos/mL). Todos os grupos foram feitos por duplicata e incubados a $30,0^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$ a 120 RPM por 96 horas, em incubadora shaker da marca “*New Brunswick Cientific*”.

Tabela 3-1. Meios de cultivo contendo o hidrolisado dos cachos vazios da palma com três fontes de nitrogênio diferentes.

Meios	Fonte nitrogenada (g.L ⁻¹)	Agente neutralizante (g.L ⁻¹)	Hidrolisado dos cachos vazios da palma		Autor
			Volumen (mL)	Concentração de açúcares (g.L ⁻¹)	
M1	(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,50)	CaCO ₃ (6,00)	50,00	(25,00)	ZHANG, 2016
M2	Peptona de soja (6,00)	CaCO ₃ (6,00)	50,00	(25,00)	ZHOU et al., 2011
M3	Ureia (1,50)	CaCO ₃ (6,00)	50,00	(25,00)	GOLDBERG et al., 1985

3.2.5. Medição da biomassa.

No final da fermentação o meio foi centrifugado separando a fração líquida da fração sólida. A fração sólida foi lavada com água deionizada e filtrada ao vácuo, posteriormente foi deixada na estufa a 80°C overnight, onde foi determinada a biomassa seca, usando uma balança analítica de marca “*BEL Engineering*”.

3.2.6. Determinação de açúcares e subprodutos por cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC).

Os açúcares, ácido fumárico e ácido láctico foram determinados por HPLC (1200, Agilent Technologies, USA) com uma coluna animex HPX-87H (300x7.8mm, Bio- Rad, USA) usando um detector de índice de refração (IR) (Agilent, HP1047A). O ácido fumárico foi analisado no detector de absorbância ultravioleta (UV) (Agilent, G1315D) a 208nm. Fizeram-se curvas padrão a partir de concentrações conhecidas destes ácidos (Figura 3-1). A coluna foi mantida a 65°C, com um fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ de uma fase móvel de H₂SO₄ ao 5mM.

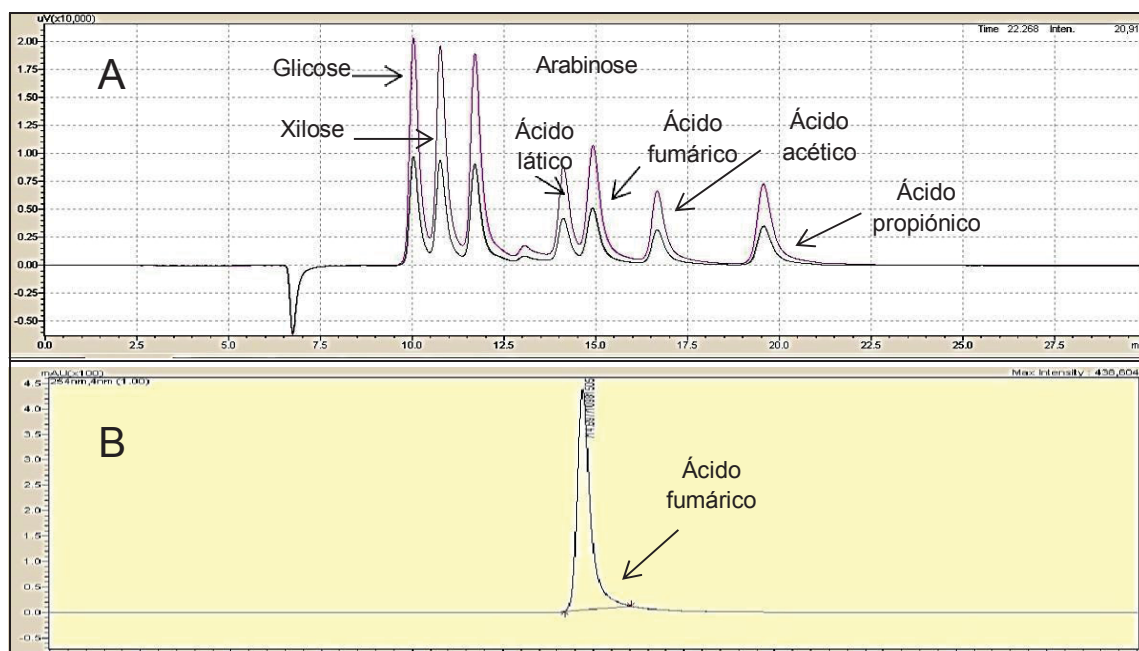


Figura 3-1. A: Cromatograma dos padrões de açúcares e ácidos orgânicos, usando o detector de índice de refração com concentrações de 1 e 2 g.L⁻¹. B: Cromatograma de ácido fumárico a 1 g.L⁻¹ usando o índice de luz UV.

3.3. Resultados e discussão.

3.3.1. Produção de esporos.

Observa-se na tabela 3-2, as contagens de esporos de *R. delemar* 34612 e *R. oryzae* 28618 no meio arroz, por 10 dias a 30°C. A contagem em câmara de Neubauer foi realizada em duplicata.

Tabela 3-2. Contagem de esporos de *R. delemar* 34612 e *R. oryzae* 28618

Cepa	Contagem celular
	(esporos/ml)
	Arroz
<i>R. delemar</i> 34612	1,15x10 ⁷
<i>R. oryzae</i> 28618	1,73x10 ⁷

Uma das dificuldades que se tem quando se trabalha com fungos é encontrar um meio de baixo custo que favoreça boa formação de esporos. O arroz é um substrato de baixo custo e nutritivo, porque nele se encontram vitaminas B1, B2, B3 e minerais importantes, além da alta quantidade de carboidratos presentes que servem para o desenvolvimento dos fungos como *Rhizopus*. A justificativa do maior tempo de esporulação em meio arroz é pela elevada quantidade de amido presente, prolongando por mais o tempo de crescimento, atrasando o processo de esporulação causado pelo estresse do esgotamento dos nutrientes. Do ponto de vista industrial pode-se ter como uma alternativa rentável em relação aos meios sintéticos, por isso o arroz não só é um substrato de baixo custo, como também favorece a produção em quantidades elevadas de esporos de *Rhizopus*.

3.3.2. Avaliação da produção de ácidos orgânicos usando os açúcares contidos no hidrolisado dos cachos vazios da palma.

As fontes nitrogenadas utilizadas são justificadas nos trabalhos GOLDBERG et al. (1985); ZHANG et al. (2016), ZHOU et al. (2015), para produzir ácido fumárico, málico e lático. Com esta informação foi definido um experimento para determinar quais substratos induzem a formação de ácidos orgânicos. Na tabela 3-3 são apresentados os valores da produção de ácido fumárico, onde não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre o uso de peptona de soja ou sulfato de amônia; embora *R. delemar* 32612 usando sulfato de amônia apresentou deferência significativa na produção de ácido fumárico em relação ao meio de fermentação usando peptona de soja e o uso de peptona de soja ou sulfato de amônia apresentou produções de ácido fumárico maiores

que quando a ureia foi usado ($p < 0,05$). Portanto o sulfato de amônia e a peptona de soja induzem a produção de ácido fumárico em *R. delemar* 34614 e *R. oryzae* 28168.

As três fontes nitrogenadas estimularam a formação de ácido fumárico; embora existam diferenças na morfologia dos fungos (Tabela 3-3). A formação de pellet em *R. delemar* 34614 e *R. oryzae* 28168 usando peptona de soja, sugere que este substrato favorece esta condição; em comparação as formas miceliares adquiridas pelos mesmos fungos em sulfato de amônia. O pellet é reportado como uma forma adequada do fungo que melhora o intercâmbio de gases no meio de cultivo, isto favorece que a quantidade de oxigênio intracelular aumente, favorecendo um ambiente oxidante que é essencial para a formação de ácido fumárico em condições limitantes de nitrogênio. Autores como WANG et al. (2015), reportam processos de otimização do inoculo em forma de *pellet* para elevar os títulos de ácido fumárico produzido.

Uma possível explicação entre as diferenças das formas de crescimento em relação às fontes nitrogenadas como a peptona de soja, sulfato de amônia e a ureia é que as sais inorgânicas (sulfatos) estimulam o aumento de biomassa favorecendo formas de crescimento como micélios, biofilmes e grumos, sendo a primeira e a última forma de crescimento a adquirida usando sulfato de amônia e ureia respectivamente. A formação desta biomassa foi notória. Existe relação entre a morfologia de crescimento e a formação de ácidos orgânicos em *Rhizopus*, sabe-se que os pellets de diâmetros pequenos produzem maiores quantidades de ácido fumárico, seguida pelos micélios, biofilmes e grumos (ZHOU et al., 2011). Segundo WANG et al., 2016 e ZHOU et al., 2011, com o aumento do número de agitações, o diâmetro do pellet tende a diminuir e aumentar o número de pellets, isto pode ser explicado porque com o aumento da turbulência evita-se a agregação de micélio favorecendo o aumento de novos pellets a partir de novo micélio no meio.

Tabela 3-3. Características morfológicas dos fungos avaliados

Condições de cultivo	Cepas	Repetições	Características morfológicas	Ácidos orgânicos (g.L ⁻¹)
Sulfato de amônio (M1)	<i>R. delemar</i> 34612	R1	Formas miceliares abundantes, pellets pequenos	Ácido fumárico (2,80±0,65)
		R2	Formas miceliares abundantes, pellets pequenos	
	<i>R. oryzae</i> 28168	R1	Biofilme no borde da superfície, formas miceliares abundantes e pellets pequenos	Ácido fumárico (1,66±0,62)
		R2	Biofilme no borde da superfície, formas miceliares abundantes e pellets pequenos	
Peptona de soja (M2)	<i>R. delemar</i> 34612	R1	Micelios abundantes e pellet pequeno	Ácido fumárico (1,49±0,29)
		R2	Biofilme e pellet	
	<i>R. oryzae</i> 28168	R1	Biofilme e pellet	Ácido fumárico (1,94±0,18)
		R2	Micelio e pellet	
Ureia (M3)	<i>R. delemar</i> 34612	R1	Biofilme	Ácido fumárico (0,27±0,10)
		R2	Biofilme	
	<i>R. oryzae</i> 28168	R1	Biofilme	Ácido fumárico (0,37±0,17)
		R2	Biofilme	

Na Figura 3-2 e Figura 3-3, são apresentados os cromatogramas usando o detector UV a 208nm de comprimento de onda, após do tempo da fermentação, onde ressaltasse a sinal do ácido fumárico com a morfologia dos fungos *R. delemar* 34612 e *R. oryzae* 28618.

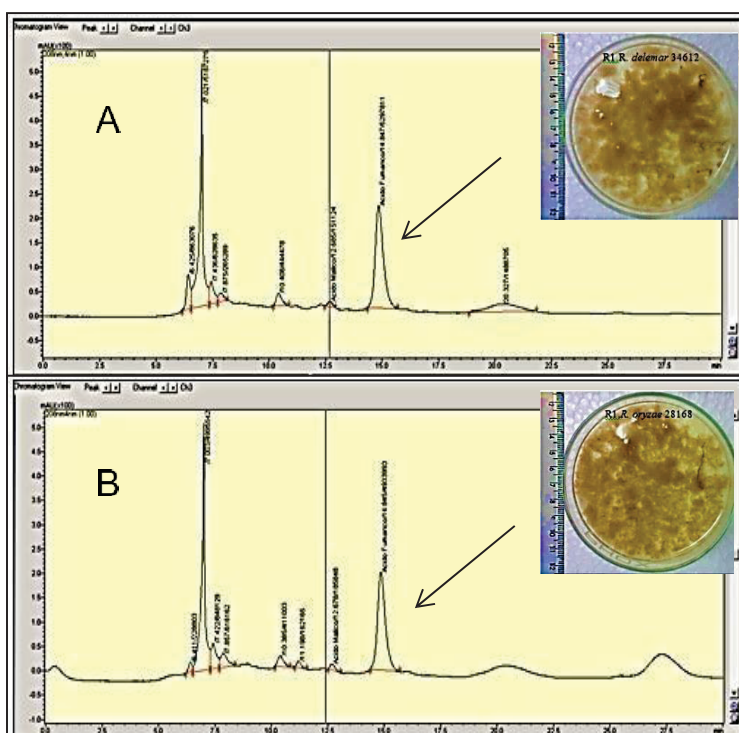


Figura 3-2. Cromatogramas ao término da fermentação. A: *R. delemar* 34612 e B: *R. oryzae* 28168 com sulfato de amônia (1,5g/L).

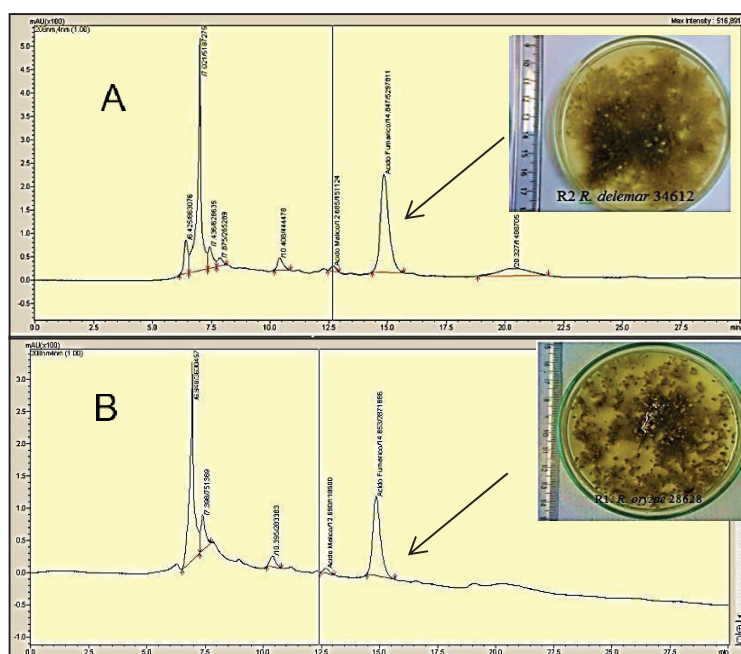


Figura 3-3. Cromatogramas ao término da fermentação. A: *R. delemar* 34612 e B: *R. oryzae* 28168 com peptona de soja (6,0/L).

Em resumo, o acompanhamento de uma fonte nitrogenada é muito importante para a biossíntese de ácido fumárico, porque a partir dela a biomassa será formada e as características dela favorecerão os títulos de ácido fumárico. A P.S e o S.A, são boas fontes de nitrogênio a ser considerados; embora a P.S, favoreça a formação de pellet e o sulfato de amônia a formação de formas micelares difusas. A ureia não é um bom substrato para a formação de biomassa adequada porque favorece a formação de grumos e biofilme.

3.3.3. Efeito da peptona de soja na produção de ácidos orgânicos.

Os efeitos da peptona de soja em relação à formação de biomassa, consumo de açúcares e produção de ácido fumárico foram avaliadas. O fungo *R. delemar* 34614 foi utilizado pelas capacidades de produzir ácido fumárico destacadas por ABE et al. (2007) e ZHOU et al. (2011). Observa-se na Figura 3-4 e Figura 3-5 o efeito das concentrações de peptona de soja na morfologia do *R. delemar* 34612. Na concentração de 6,0 g.L⁻¹ obteve-se formas miceliares unidas a pequenos pellets e também massas de micélio e grumos, na concentração de 14,0 g.L⁻¹, foi o mais homogêneo, tendo em sua maioria pellets e alguns grumos. Deve-se destacar também que a morfologia da biomassa não mudou no decorrer do tempo, apresentando as mesmas características até o final.



Figura 3-4. Biomassa de *R. delemar* 34614 formadas nos meios hidrolisados da palma com CaCO₃ e peptona de soja a 6,0 g.L⁻¹ e 14,0 g.L⁻¹, à 120 rpm, 30°C, por 172h

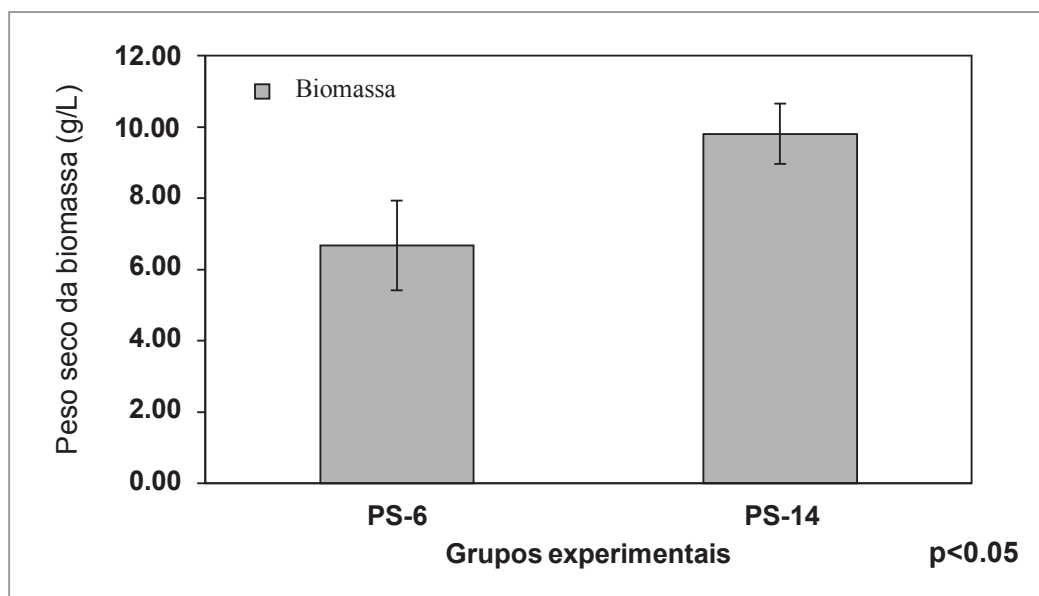


Figura 3-5. Biomassa de *R. delemar* 34614 após da fermentação com o hidrolisado dos EFB e peptona de soja a 6,0 e 14,0 g.L⁻¹, a 30°C, 120 rpm por 96 horas.

Na figura 3-6, é representado graficamente o consumo de açúcares, a diminuição da concentração de ácido acético e a formação de ácido fumárico, em 6,0 g.L⁻¹ e 14,0 g.L⁻¹ de peptona de soja. O teste usando 6,0 g.L⁻¹ de peptona de soja foi o que mostrou uma maior produção de ácido fumárico em 96 horas, em relação ao teste usando 14,0 g.L⁻¹.

A xilose foi consumida aproximadamente em um 79,60% (usando 6,0 g.L⁻¹ de PS) 77,04% (usando 14,0 g.L⁻¹ de PS) em 96 horas, nas duas avaliações. A arabinose foi utilizada em menor proporção, evidenciando-se um consumo baixo, nos dois grupos avaliados. Portanto com estes resultados confirmamos que a xilose que é o açúcar maioritário no hidrolisado da palma é consumido, assim como a glicose e menor medida a arabinose. O ácido acético presente no hidrolisado é consumido ou transformado em 72 horas. Segundo BUTKEWTISCH et al., (1929), *Rhizopus* pode utilizar o ácido acético como fonte de carbono e também como substrato sobre o que o ácido fumárico seja formado “se diz que existe uma conversão de acetato a ácido fumárico em um 30% da base molar”. Este dado mostrou que ao aumentar a concentração de ácido acético, melhorou a concentração de ácido fumárico, sempre mantendo elevado o fluxo de areação. Embora se deva ter cuidado de não elevar demais as concentrações de ácido

acético por que poderia inibir o crescimento do fungo; reportes de LENNARTSSON et al. (2009) mostraram que *Mucor indicus*, pertence ao mesmo filo que *Rhizopus*, é sensível a concentrações maiores de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$.

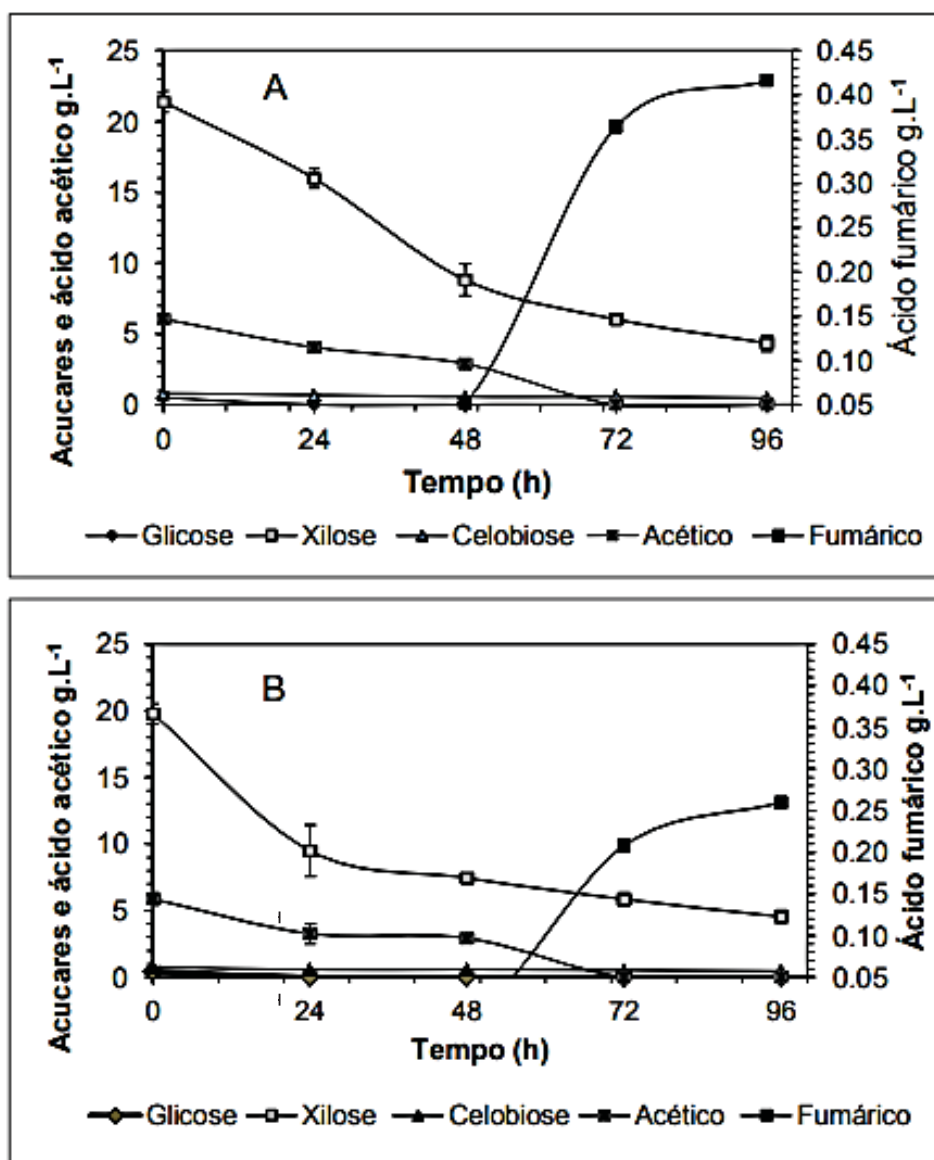


Figura 3-6. Consumo de açúcares e produção de ácido fumárico usando *R. delemar* 34614 usando meio hidrolisado dos cachos vazios da palma com CaCO_3 e peptona de soja a $6,0 \text{ g.L}^{-1}$ (A) e $14,0 \text{ g.L}^{-1}$ (B), à 120 rpm, 30°C , por 96h.

Na tabela 3-4 é apresentado os valores dos açúcares, do ácido acético e do ácido fumárico cada 24 horas durante a fermentação de *R. delemar* 34612 usando o hidrolisado dos cachos vazios da palma com 6,0 g.L⁻¹ de peptona de soja. Este teste apresentou um consumo máximo do total de açúcares no meio correspondente a 26,62% nas primeiras 24 horas, desacelerando o consumo nas seguintes horas. O consumo de açúcares nas 96 horas é de 17,8541 g.L⁻¹ que corresponde o 78,66 % do consumo total de açúcares.

Na tabela 3-5 se apresentam os valores dos açúcares, do ácido acético e do ácido fumárico cada 24 horas durante a fermentação de *R. delemar* 34612 usando o hidrolisado dos cachos vazios da palma com 14,0 g.L⁻¹ de peptona de soja. Este teste apresentou um consumo máximo do total de açúcares no meio correspondente a 52,09% nas primeiras 24 horas, desacelerando o consumo nas seguintes horas. O consumo de açúcares nas 96 horas é de 15,9745 g.L⁻¹ que corresponde o 76,12 % do consumo total de açúcares. Portanto, se deduz que ao aumentar a concentração de peptona de soja ao processo fermentativo de produção de ácido fumárico, se incrementará o consumo de açúcar nas primeiras 24 horas, induzindo a biossínteses de biomassa (Figura 3-5). Inference se que a fonte nitrogenada é o substrato para a biossínteses de proteínas de natureza estrutural (transportadores) e funcional (enzimas), favorecendo as sínteses de aminoácidos que desviam a produção de ácido fumárico, na glicólise e no ciclo de Krebs (Figura 1-5).

3.4. Conclusões.

- ✓ Determinou-se que *R. delemar* 32612 e *R. oryzae* 28618, usando uréia, sulfato de amônio e peptona de soja produziram ácido fumárico.
- ✓ Determinou-se que a peptona de soja estimula a formação de pellet, o sulfato de amônio, estimula a formação de micélio disperso e a uréia biofilme, em *R. delemar* 32612 e *R. oryzae* 28618.
- ✓ Determinou-se que a uréia como fonte nitrogenada estimula a produção de ácido fumárico em baixas concentrações. No caso de *R. delemar* 34612 usando

peptona de soja a produção de ácido fumárico foi maior em 81,87% e com sulfato de amônia 90,35%. *R. oryzae* 28618, usando peptona de soja a produção de ácido fumárico foi maior em 80,92% e usando sulfato de amônio em 77,71%.

- ✓ Determinou-se que ao aumentar a concentração de peptona de soja de 6,0 g.L⁻¹ a 14,0 g.L⁻¹ aumentou o consumo de açúcares nas primeiras 24 horas de 26,62% até 52,09% e aumentou em um 67,99 % a biomassa.

3.5. Referências

ABE, A., ODA, Y., ASANO, K., e SONE, T. *Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers. *Mycologia*, 99(5), 714-722. 2007.

BULUT S, ELIBOL M, OZER D. Effect of different carbon sources of L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochem Eng J* 21:33–37. 2004

BUTKEWITSCH, V. S.; FEDEROFF, M. tJber Bildung von Fumarsaure in den Zuckerkulturen von Mucorstolonifer (*Rhizopus nigricans*) und sein Verhalten zur Brenztraubsaure. *Biochem. Z*, vol. 206, p. 440-456, 1929

CARTA, F. S.; SOCCOL, C. R.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. bIOi gOIJI (I II < IIIIOLO Y Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. , v. 68, p. 23–28, 1999.

LENNARTSSON, P. R., KARIMI, K., EDEBO, L., e TAHERZADEH, M. J. Effects of different growth forms of *Mucor indicus* on cultivation on dilute-acid lignocellulosic hydrolyzate, inhibitor tolerance, and cell wall composition. *Journal of biotechnology*, 143(4), 255-261, 2009.

LIAO, W., LIU, Y., FREAR, C., CHEN, S. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus-*Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technol.* 98, 3415–3423, 2007.

FOSTER JW, WAKSMAN SA. The production of fumaric acid by molds belonging to the genus *Rhizopus*. *J Am Chem Soc* 61:127–1,1938.

GOLDBERG, I.; STEIGLITZ, B. Improved rate of fumaric acid production by Tweens® and vegetable oils in *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 27, no 7, p. 1067-1069, 1985

MADIGAN, T., et al. Brock Biology of microorganisms 12th edn. *Int. Microbiol*, vol. 11, p. 65-73, 2008

TENG, Y., XU, Y., WANG, D. Changes in morphology of *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation and their effect on production of mycelium-bound lipase. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 32, 397–405, 2009

WANG, G.; HUANG, D.; LI, Y.; WEN, J.; JIA, X. Bioresource Technology A metabolic-based approach to improve xylose utilization for fumaric acid production from acid pretreated wheat bran by *Rhizopus oryzae*. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, v. 180, p. 119–127, 2015.

ZHANG, L, et al. Impacts of lignocellulose-derived inhibitors on L-lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae*. *Bioresource technology*, vol. 203, p. 173-180, 2016

ZHOU, Z.; DU, G.; HUA, Z.; ZHOU, J.; CHEN, J. Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9345–9349, 2011.

Anexo

Tabela 3-4. Consumo dos açúcares e do ácido acético após da fermentação de *R. delemar* 34612, a 30°C, 120 rpm, 96 horas, usando 6,0 g.L⁻¹ de peptona de soja.

Componentes____ do médio g.L ⁻¹	Tempo (horas)				
	0	24	48	72	96
Glicose	0,4998	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Xilose	21,3798	15,9638	9,8140	6,0382	4,3610
Celobiose	0,8176	0,6913	0,5693	0,5717	0,4820
Ácido fumárico	0,0000	0,0000	0,0520	0,3640	0,4160
Ácido acético	6,0573	4,0577	2,8901	0,0000	0,0000
Consumo de açúcares	22,6971	16,6551	10,3832	6,6099	4,8430

Tabela 3-5. Consumo dos açúcares e do ácido acético após da fermentação de *R. delemar* 34612, a 30°C, 120 rpm, 96 horas, usando 14,0 g.L⁻¹ de peptona de soja.

Componentes do médio g.L ⁻¹	Tempo (horas)				
	0	24	48	72	96
Glicose	0,4421	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Xilose	19,7626	9,4850	7,4414	5,8482	4,5378
Celobiose	0,7758	0,5672	0,5788	0,5291	0,4683
Ácido fumárico	0,0000	0,0000	0,0000	0,2080	0,2600
Ácido acético	5,8640	3,2710	2,9261	0,0000	0,0000
Consumo de açúcares	20,9805	10,0522	8,0202	6,3773	5,0060

Tabela 3-6. Valores das áreas para cada concentração de ácido málico

Concentração g.L ⁻¹	Área
0.1	129661
0.3	328774
0.4	457176
0.6	692740
0.7	842381
0.9	1055900
1	1122599

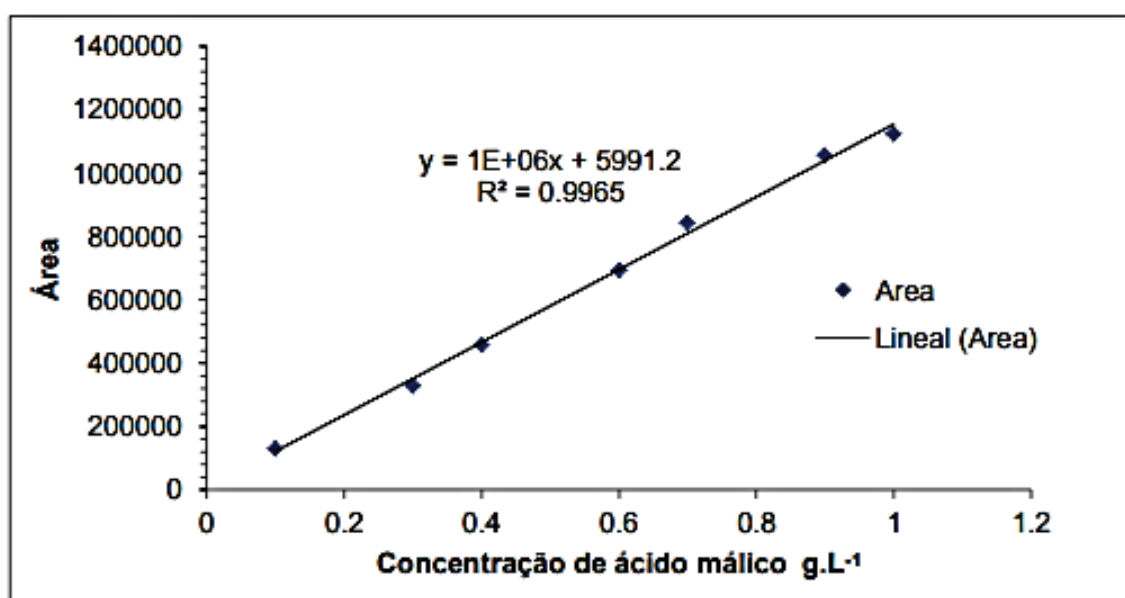
**Figura 3-7.** Curva padrão para ácido málico.

Tabela 3-7. Valores das áreas para cada concentração de ácido láctico

Concentração g.L ⁻¹	Área
0.1	717465
0.3	3315654
0.4	4282168
0.6	6977647
0.7	8208219
0.9	10479730
1	11721199

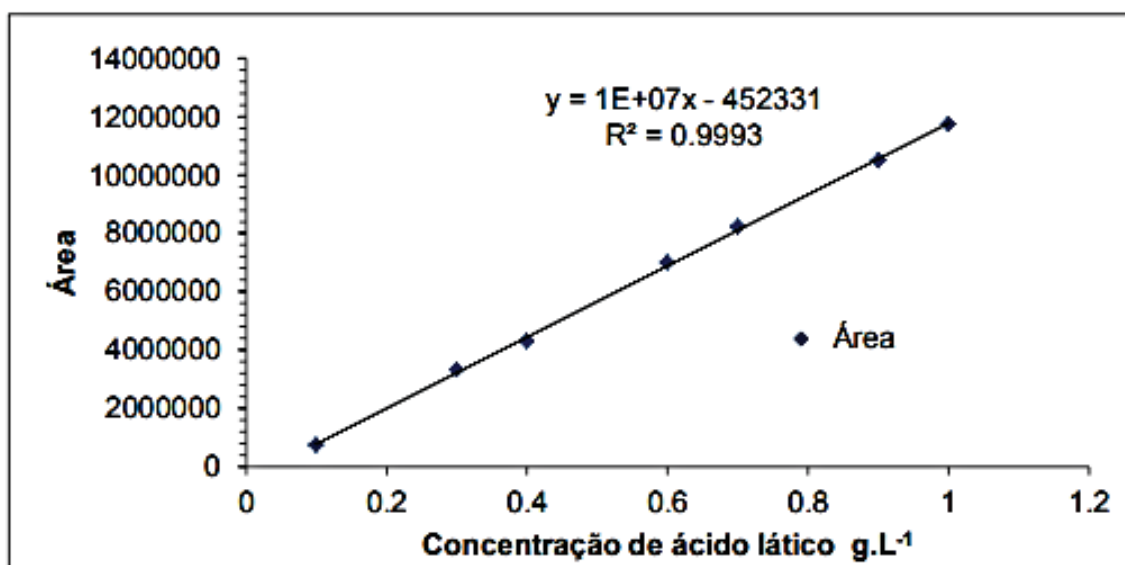
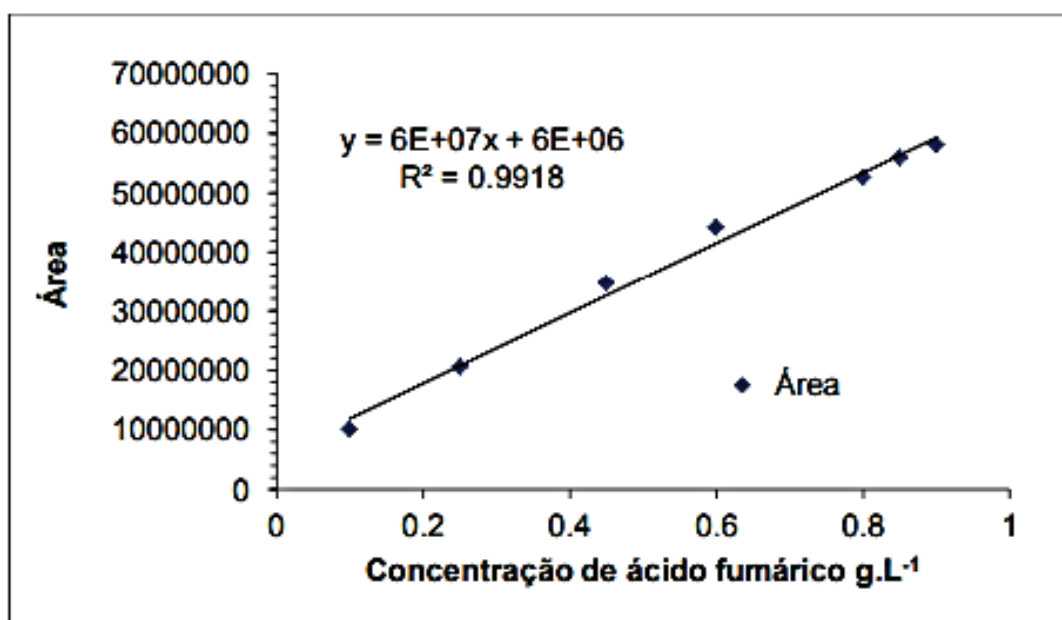
**Figura 3-8.** Curva padrão para ácido láctico.

Tabela 3-8. Valores das áreas para cada concentração de ácido fumárico

Concentração g.L ⁻¹	Área
0.10	10050548
0.25	20565609
0.45	34682255
0.60	44122160
0.80	52572536
0.85	55938113
0.90	58017279

**Figura 3-9.** Curva padrão para ácido fumárico.

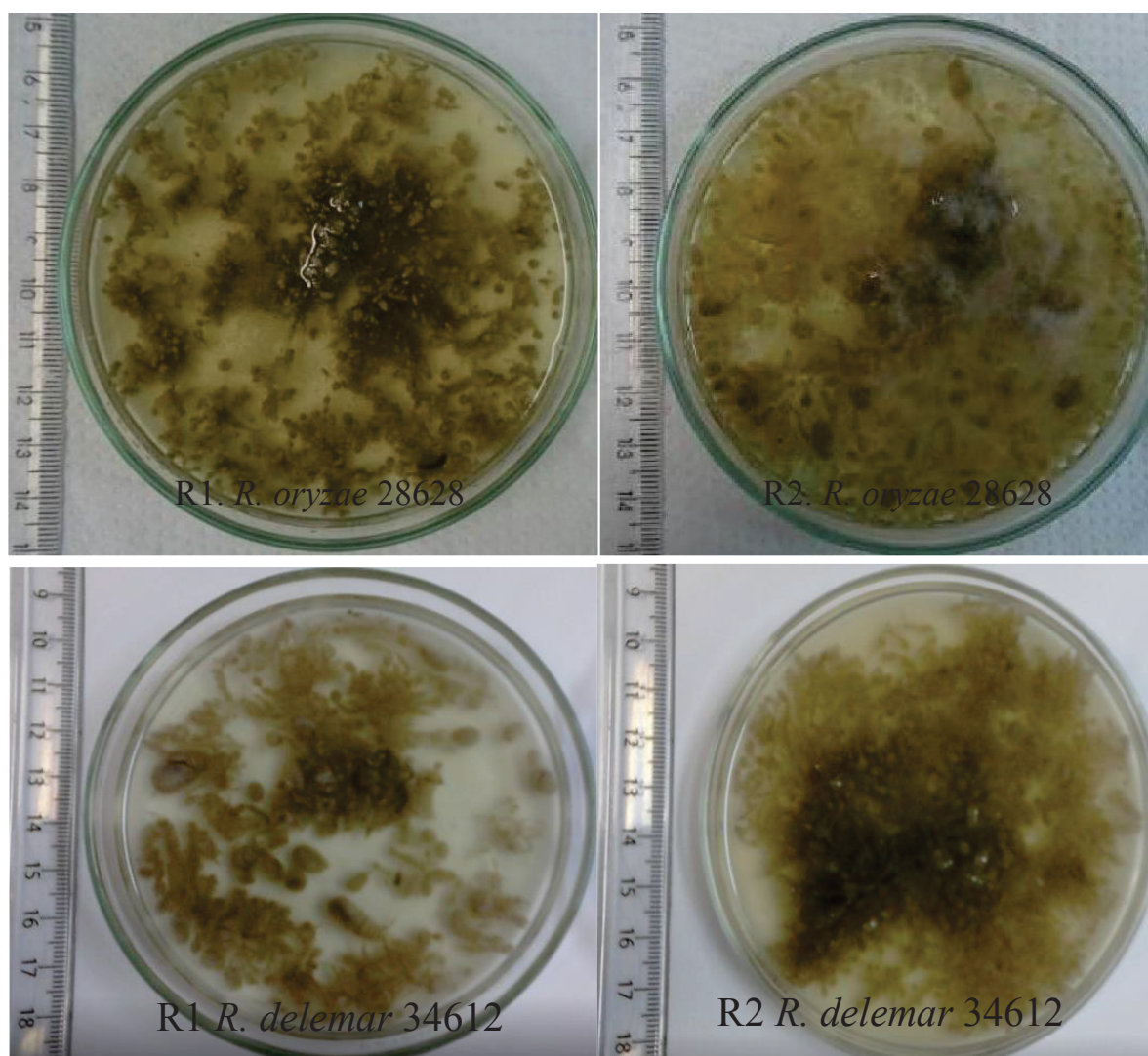


Figura 3-10. Morfologia de *R. oryzae* 28628 e *R. delemar* 34612 (6g/L de peptona de soja) no final da fermentação.

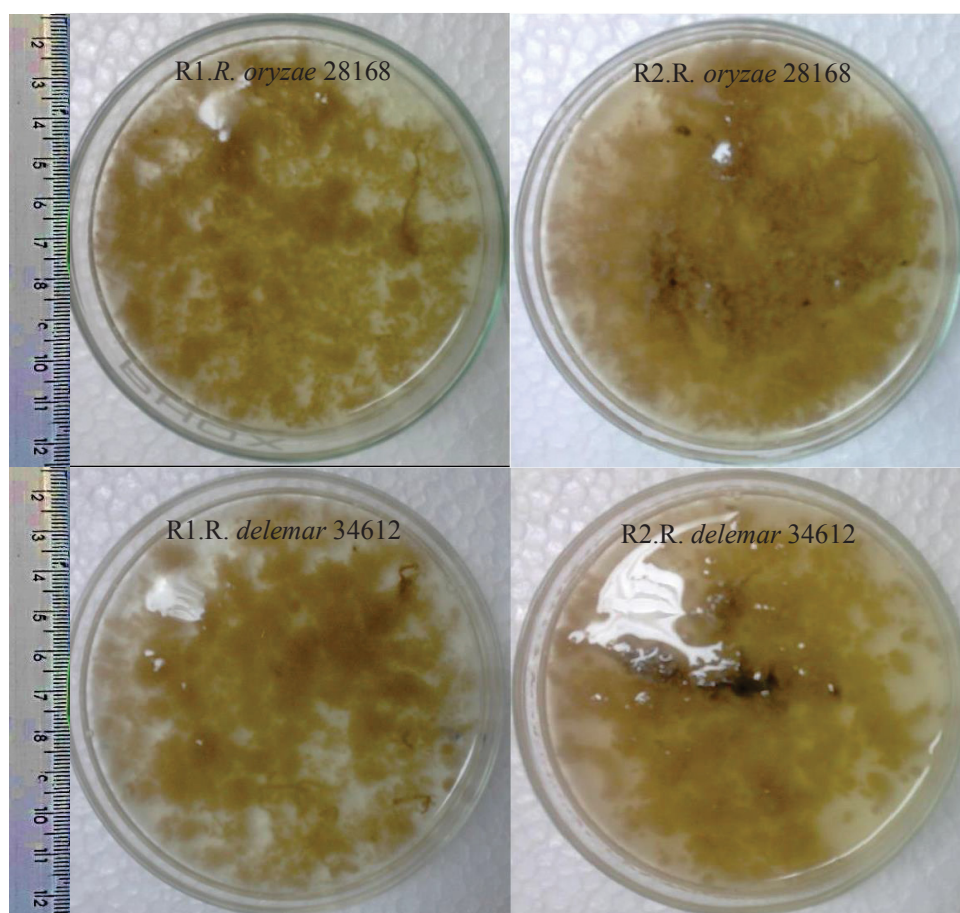


Figura 3-11. Morfologia dos fungos no meio com sulfato de amônia (1,5%) no final da fermentação.

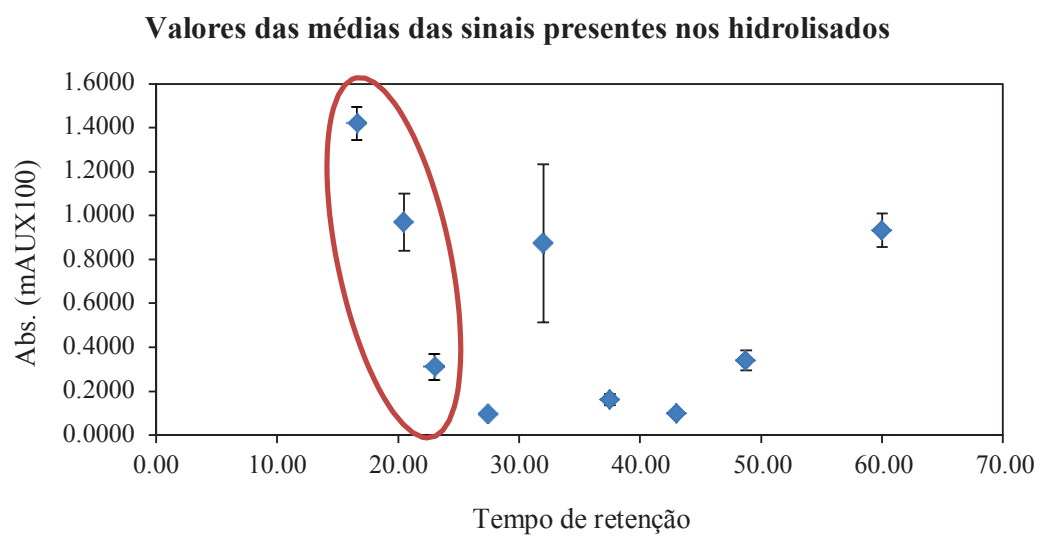


Figura 3-12. Compostos que são consumidas ou transformadas no processo de fermentação

4. Seleção de *Rhizopus* produtores de ácido fumárico

Resumo

A produção de ácido fumárico por *Rhizopus* tem sido avaliada principalmente usando glicose e resíduos industriais. A xilose é segundo carboidrato em abundância na constituição da estrutura das plantas e o seu aproveitamento é um dos grandes desafios biotecnológicos atuais. Neste trabalho avaliaram-se 17 cepas de *Rhizopus* na produção de ácido fumárico. Determinou-se pelo teste de Tukey que a produção de ácido fumárico de seis cepas de *Rhizopus* apresentam diferença significativa em relação às outras. Em um segundo teste determinou-se que três delas tem maior potencial produtor de ácido fumárico. Fermentações em concentrações de 10 e 30 g.L⁻¹ de xilose mostraram que *R. circicans* 1475 e *R. 3271* tem maiores produções de ácido fumárico. O rendimento de *R. circicans* 1475, usando peptona de soja proporcionou melhores resultados, para a produção de ácido fumárico e ácido láctico; embora *R. 395* ofereceu rendimentos similares usando sulfato de amônio. *R. 3271* é considerado como melhor consumidor de açúcares usando as duas fontes de nitrogênio.

Palavras chave: *Rhizopus*, hidrolisado dos cachos vazios da palma, peptona de soja, ácido fumárico, ácido láctico.

4.1. Introdução.

O ácido fumárico é um ácido orgânico de origem natural e foi isolado inicialmente de uma planta chamada "*Fumaria officinalis*", da qual se tomou o nome (ROA ENGEL et al., 2008). Quimicamente pode ser definido como um ácido dicarboxílico de quatro carbonos com uma dupla ligação e dois grupos carboxílicos (ZHOU et al., 2011). É um intermediário metabólico do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e é produzida por alguns *Rhizopus* usando glicose até escala piloto. Petroquimicamente é produzido a partir do anidrido maléico que é produzido a partir de butanol, tendo como inconveniente a alta contaminação ambiental. O ácido fumárico é importante porque é

utilizado como um acidulante de alimentos, em resinas de papel, em resinas alquiladas, em resinas de poliéster, ácido maléico, plastificantes (ROA ENGEL et al., 2008).

A partir dos anos 1920, foram avaliados diferentes *Rhizopus* com diferentes capacidades de produzir ácido fumárico. Comprovou-se que são sintetizados outros ácidos como o láctico, málico e acético (TAKAHASHI et al., 1927), inclusive alguns podem formar misturas de ácidos, tais como o ácido succínico e ácido oxálico (BUTKEWITSCH, 1929). As espécies mais produtoras de ácido fumárico reportadas são *R. oryzae*, *R. formosa*, *R. arrhizus* e *R. delemar* (FOSTER E WAKSMAN 1938). Um estudo interessante foi feito por ABE et al. (2007), o qual destaca que a espécie de *R. oryzae* há dois grupos que se diferenciam pela presença de uma enzima, a lactato desidrogenase "LDHA", podendo orientar seu metabolismo a produção de ácido láctico e outro grupo que não tem a LDHA e que pode produzir ácido fumárico e ácido málico em altas concentrações. Este último subgrupo chamou-se Ihe de *R. delemar* (ABE et al., 2007).

Na procura por novas fontes de carbono renovável e que não gerem competição com os cultivos vegetais orientados para alimentação, mostrou que os hidrolisados dos cachos vazios da palma são uma boa alternativa para a produção de ácido fumárico. Além disso, não existem reportes de este enfoque na literatura científica, sendo um campo não explorado e com muita projeção. Por isso neste trabalho avaliou-se a produção de ácido fumárico usando os açúcares contidos no hidrolisado ácido dos cachos vazios da palma pelas 17 cepas de *Rhizopus* do laboratório.

Objetivos.

- ✓ Determinar se as 17 cepas de *Rhizopus* tem capacidade de produzir ácido fumárico a partir dos açúcares contidos no hidrolisado dos cachos vazios da palma.
- ✓ Selecionar as melhores cepas produtoras de ácido fumárico.
- ✓ Determinar se existe biossíntese de outros ácidos orgânicos.
- ✓ Selecionar o fungo com melhores rendimentos de ácido fumárico.

- ✓ Determinar se a morfologia de *Rhizopus* no processo de fermentação influi na produção de ácido fumárico.

4.2. Materiais e métodos.

4.2.1. Biomassa vegetal.

Os cachos vazios dos frutos da palma (EFB) foram obtidos da fábrica de Palma da empresa Vale localizada em Mojú, estado de Pará, Brasil. Foram moídos e peneirados. Utilizou-se a fração da biomassa compreendida entre 0,35 a 0,42 mm de diâmetro (MEDINA et al., 2016), seguida de uma secagem a 80°C por 24 horas.

4.2.2. Hidrolise ácida.

Foram pegos 10 gramas de EFB (0,35-0,42 mm) e misturados com 100 ml de uma solução de ácido sulfúrico de 1,5%, posteriormente foi hidrolisado na autoclave a uma temperatura de 130°C por 15 minutos (SOBRAL, 2016). No final da hidrolise o material foi filtrado e o líquido foi ajustado a um pH de 4,0 usando NaOH (4M) (WANG et al., 2015), após da neutralização, o líquido foi filtrado usando papel filtro qualitativo de 12 µm e armazenado a 4°C na geladeira.

4.2.3. Produção de esporos.

A propagação dos esporos das 17 cepas de *Rhizopus* foi avaliada no médio contendo só arroz. Tomou-se 60 gramas de arroz parabolizado “Tio João”, lavou-se com água e posteriormente foi aquecida por 20 minutos, a água descartou-se e foram pesada 50 gramas de arroz e depositada em matraz erlemeyer de 500 mL; os esporos formados foram lavados com 50 mL de água destilada estéril e tween 80 (0,5%). De cada cultivo puro dos *Rhizopus* foi transferido ao meio arroz uma alçada de micélio, sendo incubado a 30°C entre 7 a 23 dias. A contagem dos esporos foi feita usando uma câmara de Neubauer (0.0025 mm²) usando um microscópio ótico a 40X da marca “OLYMPUS CX41” (MADIGAM et al., 2008).

Tabela 4-1. Cepas de *Rhizopus* pertencentes à coleção do banco de linhagens do laboratório de processos biotecnológicos (LPB) da Universidade Federal do Paraná.

Número	Codificação no LPB
1	<i>R. arrhizus</i> 16179
2	<i>R. oligosporium</i> 3267
3	<i>R. delemar</i> 1472
4	<i>R. delemar</i> 34612
5	R. 5905
6	R. 395
7	R. 3271
8	<i>R. oligosporium</i> 25975
9	<i>R. arrhizus</i> 2582
10	<i>R. circicans</i> 1475
11	<i>R. oryzae</i> 28168
12	<i>R. oryzae</i> 28627
13	R. 28169
14	R. oligosporium 2710
15	<i>R. formosa</i> 28422
16	R. 3562
17	<i>R. arrhizus</i> 28425

4.2.4. Meio de fermentação para primeira seleção de *Rhizopus* produtores de ácido fumárico.

O meio de fermentação favoreceu o desenvolvimento dos *Rhizopus*. Este meio continha a seguinte composição: açúcares dos hidrolisado (22,0 g.L⁻¹), peptona de soja (6,0 g.L⁻¹), carbonato de cálcio (6,0 g.L⁻¹), sendo o pH de 7,2. O conteúdo foi acondicionado em erlenmeyer de 120 ml com 20 ml de volume de meio. Após 24 horas, adicionou-se carbonato de cálcio (30 g.L⁻¹) (Modificado de WANG et al., 2015). O meio de cultivo e o carbonato de cálcio adicionado em pó foram esterilizados em autoclave a 121°C, por 15 minutos a 1,0 atmosferas de pressão. Aproximadamente 1,0 ml de

suspensão de esporos com concentrações entre 10^6 e 10^7 esporos. mL⁻¹ serviram como inóculo. Os cultivos foram incubadas em shaker a 30°C, 120 rpm por 96 horas.

4.2.5. Meio de fermentação para a segunda seleção de *Rhizopus*.

Os meios de fermentação para a segunda avaliação são descritos na tabela 4-2. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos a 1 atmosfera. Foi adicionado 1 mL de uma suspensão de esporos de aproximadamente 1×10^7 esporos. mL⁻¹ ao meio de fermentação, contendo um volume de 20 mL de meio em um erlenmeyer de 150 mL de capacidade. Os meios de fermentação foram incubados em shaker rotatório a 120 rpm a 30°C por 96 horas. Os pH inicial dos meios foram corrigidos a 7,0; usando NaOH (4M).

Tabela 4-2. Composição dos meios de fermentação na segunda avaliação.

Meios	Concentrações g.L ⁻¹	
4M-1		
Açúcares	10	30
Peptona de soja	6	
CaCO ₃	6	
4M-2		
Açúcares	10	30
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5	
CaCO ₃	6	

4.2.6. Medição da biomassa.

Ao término da fermentação o conteúdo foi colocado num tubo de centrífuga “*Falcon*” de 50ml, sendo centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos. A biomassa precipitada foi retirada e colocada em uma placa de Petri onde se analisou a morfologia, posteriormente foi filtrada usando um papel de filtro (Qualit de 80 g e 18,5 cm de diâmetro) e deixada overnight a 80°C em estufa (Orión). A biomassa seca foi determinada em balança analítica (Bel Engineering). O valor da biomassa seca é obtido subtraindo a massa seca menos a massa seca do papel de filtro.

4.2.7. Determinação de açúcares e subprodutos por cromatografia líquida de alta eficácia (HPLC).

Ao líquido coletado (15 ml) depois da centrifugação determinou-se o pH (medidor de pH mPA210). Posteriormente as amostras foram aquecidas no forno micro-ondas por 7 segundos, para elevar a temperatura, e levar o valor do pH até 2 usando HCl (4,0M). Fizeram-se diluições 1:10 com água miliQ e filtrações com membrana de 0,22 μm . As amostras foram injetadas no HPLC (1200, Agilent Technologies, USA) com uma coluna animex HPX-87 (300x7.8mm, Bio-Rad, USA) usando um detector de índice de refração (IR) (Agilent, HP1047A).

4.1. Resultados e discussão.

4.3.1. Produção de esporos.

Na figura 4-1, apresentam-se os resultados da quantidade de esporos produzidos no meio arroz em 10 dias a 30°C. Os resultados variam conforme a cepa; algumas delas se caracterizam pela abundante quantidade de esporos produzidos e outras pela baixa quantidade. *R. oligosporium* 25975 apresentou uma quantidade de esporos de $1,96 \times 10^7$ esporos/ml e foi o melhor produzindo esporos, seguida de *R. arrhizus* 2582, *R. oligosporium* 3267, *R. oryzae* 28168, *R. oligosporium* 2710, *R. 28169*, tendo todos eles uma concentração de esporos/ml igual ou superior a $1,59 \times 10^7$. *R. formosa* 28422 apresentou, a mais baixa concentração de esporos ($4,96 \times 10^6$ esporos.ml⁻¹). *R. circians* 1475, apresentou uma concentração de esporos baixa ($8,90 \times 10^6$ esporos.ml⁻¹), *R. 395* obteve $7,38 \times 10^6$ esporos.ml⁻¹ e *R. 3271* tem $1,27 \times 10^7$ esporos.ml⁻¹. Cabe mencionar *R. oligosporium* e *R. oryzae* produziram maior quantidade de esporos que outras espécies.

O tempo de incubação variou no tempo dependendo da produção de esporos. Os fungos *R. oligosporium* 25975, *R. oryzae* 28168, *R. oligosporium* 2710, *R. 28169*, *R. 3562*, *R. 395* e *R. arrhizus* 28425, produziram boa quantidade de esporos em menos de 10 dias. Os fungos que demoraram mais tempo na produção de esporos são *R. arrhizus* 2582, *R. oligosporium* 3267, *R. arrhizus* 16179 e *R. 5905*. Existe uma clara evidência de que alguns *Rhizopus* não produzem elevadas quantidades de esporos, mesmo até os 23 dias de incubação, podendo-se explicar este fenômeno por características

genotípicas inerentes a cada Rhizopus. O importante é que o arroz demonstrou ser para a maioria um substrato de baixo custo para produzir esporos.

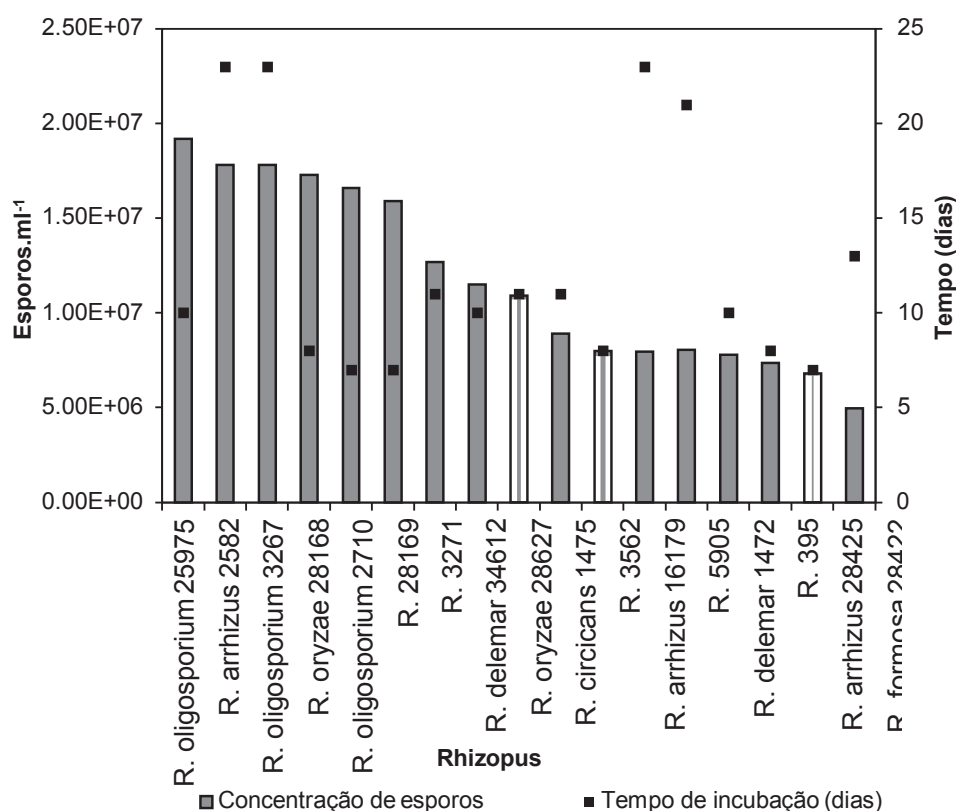


Figura 4-1. Concentração de esporos das 17 espécies de Rhizopus no meio arroz e o tempo de incubação.

4.3.2. Produção de ácido fumárico: primeira seleção

Ao término das fermentações, foi determinada a concentração de ácido fumárico (Figura 4-2). R. 395 é o fungo que apresentou maior produção de ácido fumárico com $2,48 \pm 1,65 \text{ g.L}^{-1}$, seguida de *R. circicans* 1475 ($2,25 \pm 1,51 \text{ g.L}^{-1}$), R. 3271 ($1,96 \pm 0,30 \text{ g.L}^{-1}$), *R. delemar* 34612 ($1,49 \pm 0,14 \text{ g.L}^{-1}$), *R. oligosporium* 3267 ($1,41 \pm 0,22 \text{ g.L}^{-1}$) e R. 5905 ($1,18 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}$). Todos eles tinham pellet ou micélios, exceto *R. oligosporium* 3267, que predominou a morfologia de grumo. O fungo com maior massa seco na biomassa foi *R. arrhizus* ($12,37 \pm 0,23$). Estes fungos diferem dos outros, por produzir mais de 1.0 g.L^{-1} de ácido fumárico. Utilizando o teste de ANOVA,

baseado na análise de variância, com todos os fungos, observaram-se que a variância das médias das produções de ácido fumárico dos fungos R. 395, *R. circicans* 1475, *R. oryzae* 28168, são elevadas, por isso foram separadas de um segundo análise de ANOVA, concluindo que existe diferença significativa pelo menos em um dos grupos. Usando o teste de Tukey, determinou-se que existe diferença significativa de R. 3271, *R. delemar* 34612, *R. oligosporium* 3267 e R. 5905, frente ao resto dos outros *Rhizopus*. Além disso, determinou-se que a média da produção de ácido fumárico de R. 3271 apresenta diferença significativa em relação aos outros fungos. Cabe ressaltar que dois dos fungos separados inicialmente são os primeiros produtores de ácido fumárico.

Analisando a figura 4-2, se aprecia que os maiores produtores de ácido fumárico, no inóculo não tem uma concentração de esporos elevada, assim como a biomassa formada, portanto pode se interpretar que as 17 cepas de *Rhizopus* avaliadas não dependem exclusivamente da concentração de esporos, senão das características fisiológicas que envolvem a cada fungo, sua adaptação aos inibidores do hidrolisado e ao substrato no meio de cultivo. O que se desprende da Figura 4-2, é que R. 3271, *R. delemar* 34612, *R. oligosporium* 3267 e R. 5905 apresenta diferença significativa frente as outras cepas e que R. 395, *R. circicans* 1475, por ter elevada a desvio padrão, foram consideradas para uma segunda avaliação e seleção de produtores de ácido fumárico.

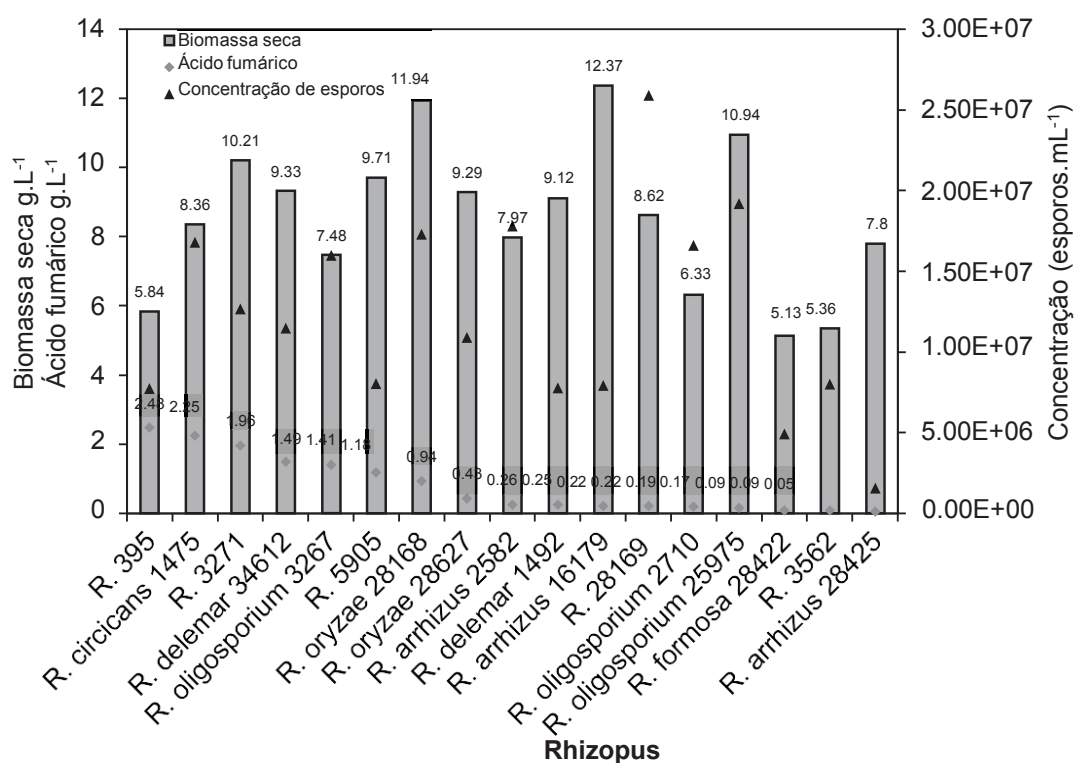


Figura 4-2. Produção de ácido fumárico e sua correlação com a biomassa seca e a quantidade de esporos utilizada na fermentação.

Na figura 4-3, Existe uma correlação entre a formação de ácido fumárico e a forma da biomassa. Formas miceliares e os pellets, pelo pequeno tamanho (<3,0mm) ajudam a que o fungo tivera maior contato com os componentes do meio para se alimentar e realizar o intercambio gasoso pela influencia da agitação. Neste experimento foi usada a temperatura ótima de crescimento e de formação de ácido fumárico (30°C); embora o nível de agitação usado, foi o mais baixo (120 rpm), já que são reportadas normalmente 180, 200 e 220 rpm (ZHOU et al., 2011). A formação de ácido fumárico acontece em condições oxidantes ou em concentrações elevadas de O₂ por isso é importante em trabalhos de otimização utilizar um nível maior de agitação.

4.3.4 Análise da biomassa formada.

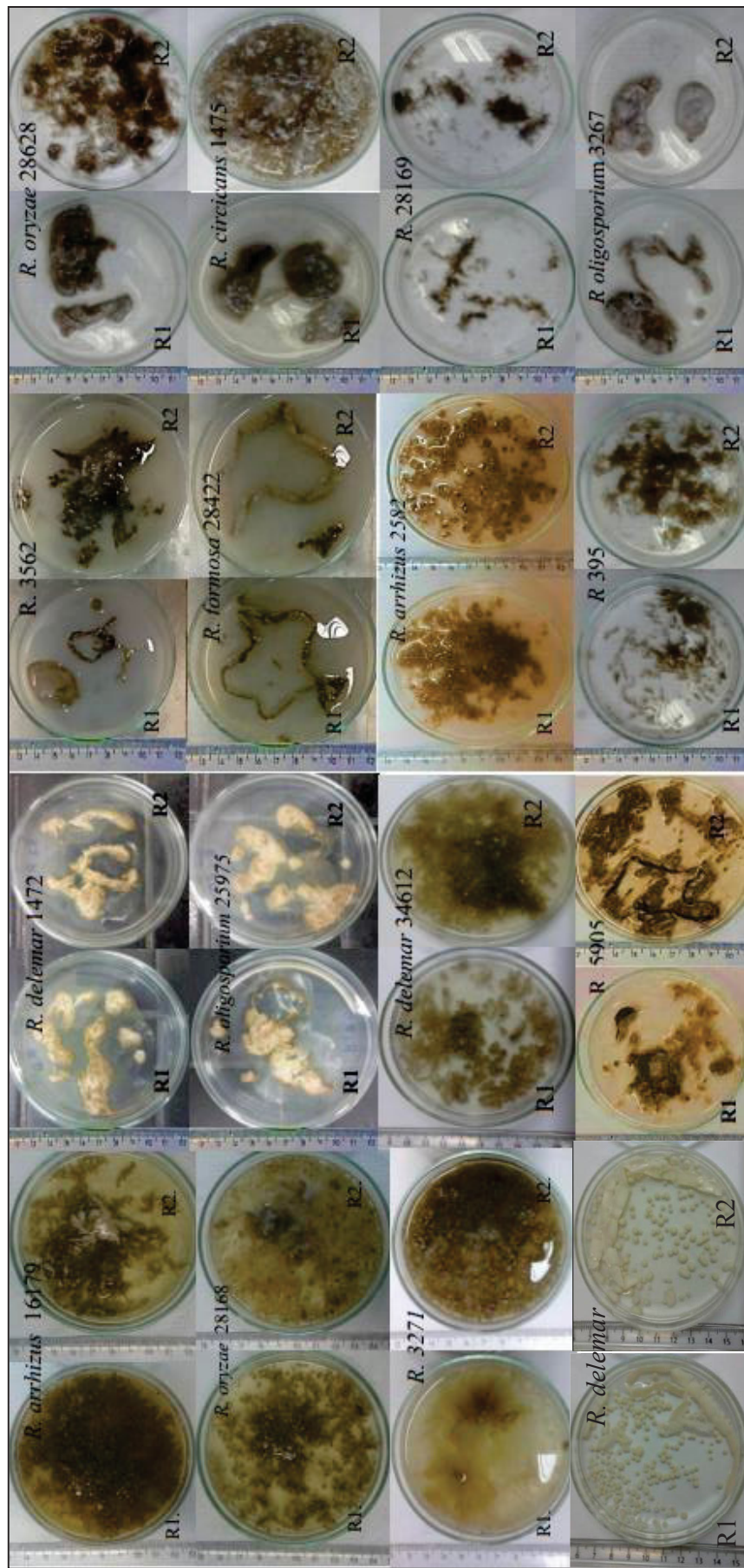


Figura 4-3. Morfologias das biomassas dos *Rhizopus* avaliados

Segundo SOBRAL, (2016), na hidrolises ácida dos cachos vazios da palma são liberadas moléculas da estrutura da lignina, ela reportou 1,10% de lignina solúvel. MEDINA et al., 2016, sinala a liberação de ácido p-hidroxibenzoico e ácido ferrulico que tem atividade antimicrobianas em bactérias e leveduras. *Rhizopus* tem sido reportado como produtor de enzimas degradadoras de compostos fenólicos. A produção de tanases atuando sobre o ácido tânico formando ácido gálico tem sido reportado em *R. oryzae* (HADY et al., 1994; PUROHIT et al., 2006), *Rhizopus microsporus* var. chinensis e *Rhizopus stolonifer* conseguem degradar o ácido vanílico em álcool vanílico e *Rhizopus microsporus* var. chinensis em vanilina (GUIRAUD et al., 1992), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (AL-TURKI, 2009), *R. arrhizus* apresenta boa capacidade de degradar o antraceno (KRIVOBOK et al., 1998). *R. oryzae* é utilizado no branqueamento da polpa Kraft, reduzindo a toxicidade dos componentes fenólicos (PEREIRA et al., 2009), e outras espécies com capacidade de sintetizar enzimas que degradem a poly (caprolactona) diol (PCL) na degradação de plásticos (TOKIWA e SUZUKI 1997). Por estes motivos fica claro que algumas espécies de *Rhizopus* tem a capacidade de degradar compostos aromáticos presentes no hidrolisado dos cachos vazios da palma.

As capacidades de hidrolisar algumas moléculas aromáticas presentes no hidrolisado são inegáveis; embora, são reportadas algumas consequências da exposição destas moléculas é que alguns *Rhizopus* podem ter estresse, influenciando na eficiência do consumo dos açúcares e produção de ácidos orgânicos. Segundo PALMQVIST (2000), o furfural pode inibir e afetar a velocidade específica de crescimento e o rendimento de biomassa e o ATP. Outros compostos fenólicos podem causar partição e perda da integridade da membrana celular, afetando sua atividade de assimilar açúcares e por tanto a integridade da membrana celular. Possivelmente seja uma explicação para alguns *Rhizopus* como *R. 28169* e *R. arrhizus 2582* que tiveram rendimentos baixos de biomassas e de ácido fumárico.

4.3.5. Produção de ácido fumárico: segunda seleção.

Na tabela 4-3, são apresentados os resultados das fermentações com 6,0 g.L⁻¹ de peptona de soja no meio, usando os seis *Rhizopus* escolhidos por serem os maiores produtores de ácido fumárico. O mesmo ácido foi produzido com concentrações de até 4,67 g.L⁻¹ por *R. circicans* 1475, sendo pellets e micélios sua morfologia. O ácido láctico foi detectado em *R. oryzae* 28168 em baixas concentrações (0,06±0,02 g.L⁻¹).

Tabela 4-3. Determinação da biomassa e produção de ácidos orgânicos usando peptona de soja (6,0 g.L⁻¹)

Codificação de <i>Rhizopus</i>	Produção de Ác. Fumárico (g.L ⁻¹)	Produção de Ác. Láctico (g.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Descrição da biomassa
<i>R. circicans</i> 1475	4,67±0.05	0	6,72±0.23	Micélios e pellet menores (bom crescimento)
R. 395	3,23±0.67	0	4,83±0.41	Biofilme e pellet (abundante)
<i>R. delemar</i> 34612	2,69±0.11	0	5,84±0.36	Pellet em cachos, biofilme; micélios e pellet.
R. 3271	2,54±0.20	0	7,17±1.26	Micélio e pellet em cachos; grumo e micélios.
<i>R. oligosporium</i> 3267	1,41±0.22	0	4,53±0.62	Grumo e micélios
<i>R. oryzae</i> 28168	1,03±0.72	0,06±0,02	6,33±0.18	Micélios e biofilme

Nestes resultados se evidencia que a peptona de soja é um substrato adequado para estimular a formação de ácido fumárico nas espécies de *Rhizopus*. Os resultados da tabela 4-3 e figura 4-4, demonstram que quatro, dos seis fungos escolhidos tem um bom potencial para continuar avaliando este processo usando peptona de soja. A morfologia observada pelos maiores produtores de ácido

fumárico tem como denominador o pellet e micélios, embora os fungos *R. oligosporium* 3267 e *R. oryzae* 28168, que não produziram muito ácido fumárico, formaram grumos, micélios e biofilme, podendo-se explicar diretamente que os açúcares presentes no hidrolisado dos EFB e a peptona de soja, não estimulam a produção de ácido fumárico. Destaca-se também que *R. oligosporium* 3267, sempre evidenciou a forma preferencial de grumos como forma de crescimento em todas as avaliações e repetições.

Na figura 4-4, apresentam-se os dados que ressaltam a produção de ácido fumárico em relação ao consumo de açúcares, onde a maior produção de ácido fumárico foi por *R. 395* e *R. circicans* 1475 mas marcada por um baixo consumo de açúcares; os outros fungos que consumindo maior quantidade de açúcares produziram menor quantidade de ácido fumárico.

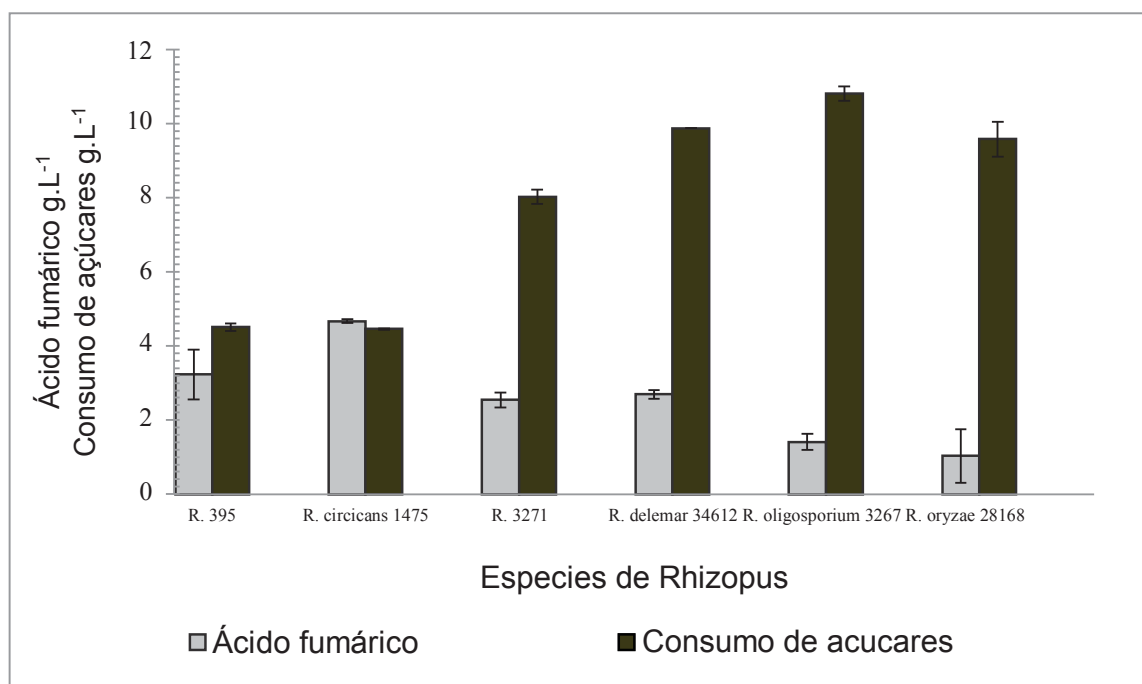


Figura 4-4. Produção de ácido fumárico e consumo de açúcares usando peptona de soja.

Na tabela 4-4, se apresentam os resultados das fermentações com 1,5 g.L⁻¹ de sulfato de amônia no meio, usando os seis *Rhizopus* escolhidos por serem os maiores produtores de ácido fumárico. O mesmo ácido foi produzido com concentrações de até 3,67g.L⁻¹ por *R. 3271*, sendo pellets e micélios sua morfologia. O ácido láctico foi detectado em *R. circicans 1475* (3,00 g.L⁻¹±0,82 g.L⁻¹), *R. 395* (0,93±0,66 g.L⁻¹) e *R. oryzae 28168* em baixas concentrações (0,05±0,03 g.L⁻¹).

Tabela 4-4. Determinação da biomassa e produção de ácidos orgânicos usando sulfato de amônia (1,5 g.L⁻¹).

Codificação de <i>Rhizopus</i>	Produção de Ác. Fumárico (g.L ⁻¹)	Produção de Ác. Láctico (g.L ⁻¹)	Biomassa (g.L ⁻¹)	Descrição da biomassa
R. 3271	3,67±0,10	0	8,54±0,79	Micélio e pellet
R. 395	3,41±0,04	0,93±0,66	5,28±0,33	Grumo; biofilme.
<i>R. circicans 1475</i>	2,89±0,87	3,00±0,82	6,92±1,69	Biofilme abundante; escasso pellet.
<i>R. delemar 34612</i>	1,32±0,93	0	5,93±0,12	Micélio, poucos pellets; biofilme.
<i>R. oryzae 28168</i>	2,49±0,61	0,05±0,03	6,85±0,50	Biofilme, pellet abundantes e pequenos; micélios.
<i>R. oligosporium 3267</i>	1,30±0,22	0	5,61±0,66	Biofilme e poucos pellets; micélio.

Na tabela 4-4 e figura 4-5, usando sulfato de amônia, (3) dos (6) fungos avaliados apresentam potencial para produzir ácido fumárico e (2) fungos que poderiam avaliar para produzir o ácido láctico (*R.395* e *R. circicans* 1475). Estes resultados denotam que *R. 395* e *R. circicans* 1475 tem as capacidades metabólicas para produzir ácidos orgânicos usando como fonte nitrogenada a peptona de soja e o sulfato de amônia. Embora *R. circicans* 1475 produziu os maiores títulos de ácido láctico ($3,00 \pm 0,82 \text{ g.L}^{-1}$), por cima de *R. 395* ($0,93 \pm 0,66$), sendo este último classificado como bom produtor de ácido láctico por Liu et al. (2006). A morfologia apresentada nos fungos usando sulfato de amônia não foi homogênea, apresentando grumos e biofilme (*R. 395*) e biofilme abundante e escassez de pellet (*R. circicans* 147). Estes resultados evidenciam que a capacidade de produzir ácido láctico é uma característica metabólica intrínseca destes fungos, podendo-se melhorar com as otimizações da morfologia.

Na figura 4-5, apresentam-se os dados da produção de ácido fumárico em relação ao consumo de açúcares, onde a maior produção de ácido fumárico foi por *R. 3271* e *R. circicans* 395. O consumo de açúcares foi menor em relação a peptona de soja. Os meios de fermentação foram incubados a 30°C a 120RPM por 96 horas.

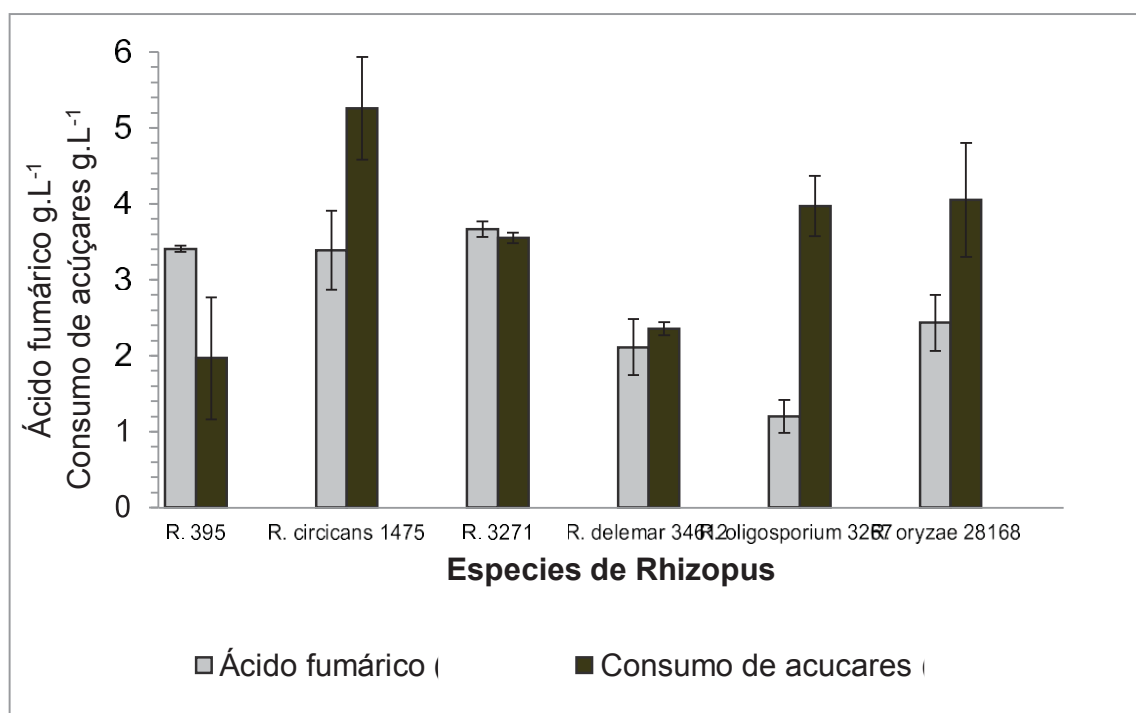


Figura 4-5. Produção de ácido fumárico e consumo de açúcares, usando sulfato de amônia.

A peptona de soja é o principal substrato para produzir ácido fumárico em relação a sulfato e amônia e ureia, este último substrato foi avaliado com *R. delemar* 34614 anteriormente. *R. 395*, usando peptona de soja produziu 3,41 g.L⁻¹ de ácido fumárico em relação aos 3,23 g.L⁻¹ obtidos usando sulfato de amônia, o que representa o 94,72% de ácido fumárico produzido com peptona de soja; além disso, sintetizou também ácido láctico usando sulfato de amônia; este fungo diminuiu a produção de ácido fumárico por sintetizar ácido láctico como pode-se ver nos resultados. Em relação a *R. circicans* 1475, existe uma mais clara evidência da diminuição da produção de ácido fumárico usando sulfato de amônia, esta diminuição corresponde ao 38,12% de ácido fumárico; além disso, sintetizou-se ácido láctico em concentrações altas (3,00 g.L⁻¹), portanto pode-se afirmar que a diminuição da produção de ácido fumárico com sulfato de amônio pode-se atribuir a produção de ácido láctico.

A quantidade de açúcares consumidos foi diferente, porque nem todos os fungos usaram todo o açúcar disponível. Os maiores consumidores de

açúcares totais são *R. 3271*, *R. delemar* 34612, *R. oligosporium* 3267, *R. oryzae* 28168 (peptona de soja) que vão de 8 até 11 g.L⁻¹ e os menores consumidores foram *R. 395* e *R. circicans* 1475 em torno de 2 a 4 g.L⁻¹ (Peptona de soja e sulfato de amônia). Um fato importante destacou aqui, porque sendo estes últimos fungos os maiores produtores de ácido fumárico e ácido láctico são os que menos açúcares consomem, uma possível explicação para este fato, pode ser que estes fungos utilizarem outros componentes do meio que não se tinham detectado, como os componentes fenólicos produto da solubilização da lignina na hidrólise ácida, esta hipótese deveria era objeto de outros experimentos.

Na figura 4-6, verificou-se que não existe diferença significativa nos valores das biomassas secas dos fungos em relação a fonte nitrogenada, entretanto percebam-se uma tendência de que a utilização de sulfato de amônia estimula a produção de mais biomassa em relação à peptona de soja.

Apresentam-se na figura 4-6 a massa seca das biomassas dos fungos avaliados. Determinou-se no análise dos dados que não existe diferença significativa entre o uso da peptona de soja e o sulfato de amônia, na produção de maior quantidade de biomassa. Embora, seja claro que analisando a morfologia das biomassa, usando sulfato de amônia, elas produzem micélio e grumos a diferença dos pellets e formas micelares que se obtém usando peptona de soja. Segundo ZHENGXIONG et al., 2011, o uso de sais inorgânicas favorece a formação de grumos acumulando biomassa, possivelmente seja o que ocorre; embora, não exclua o potencial intrínseco da produção de ácidos orgânicos destes fungos.

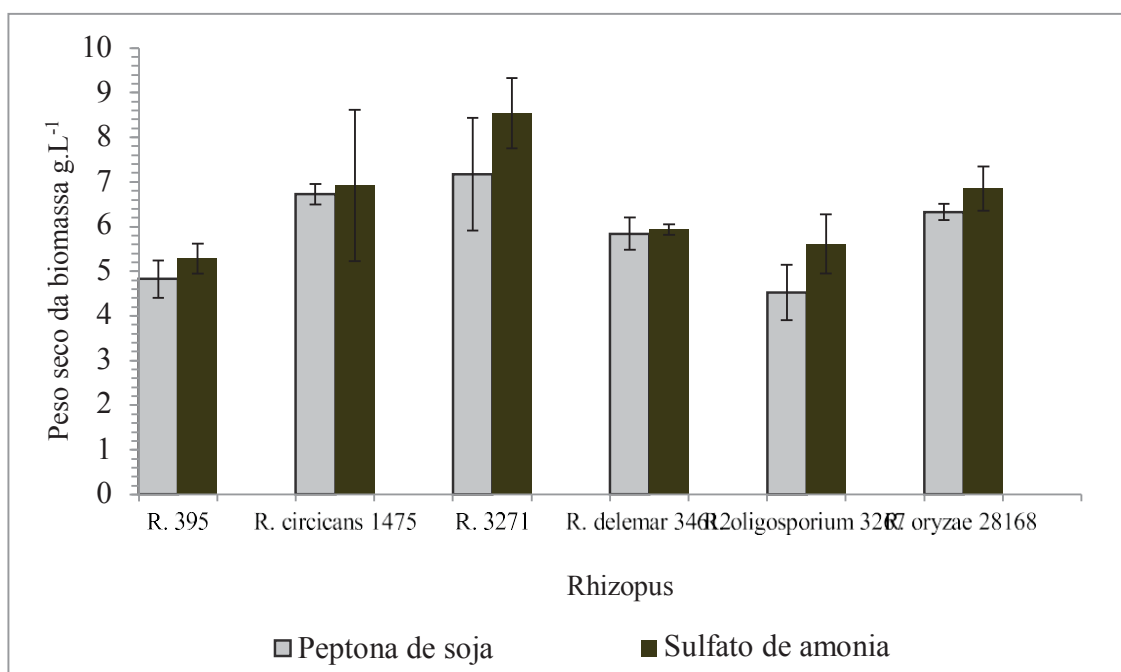


Figura 4-6. Determinação da biomassa seca das espécies de *Rhizopus* usando hidrolisado dos cachos vazios da palma com diferentes fontes nitrogenadas.

4.3.5. Produção de ácido fumárico usando três cepas

Na figura 4-7, se apresentam os resultados de produção de ácido fumárico, ácido láctico, consumo de açúcares e produção de biomassa fúngicas usando *R. circicans* 1475 (A), *R. 395* (B) e *R. 3271* (C), no meio hidrolisado da palma com peptona de soja.

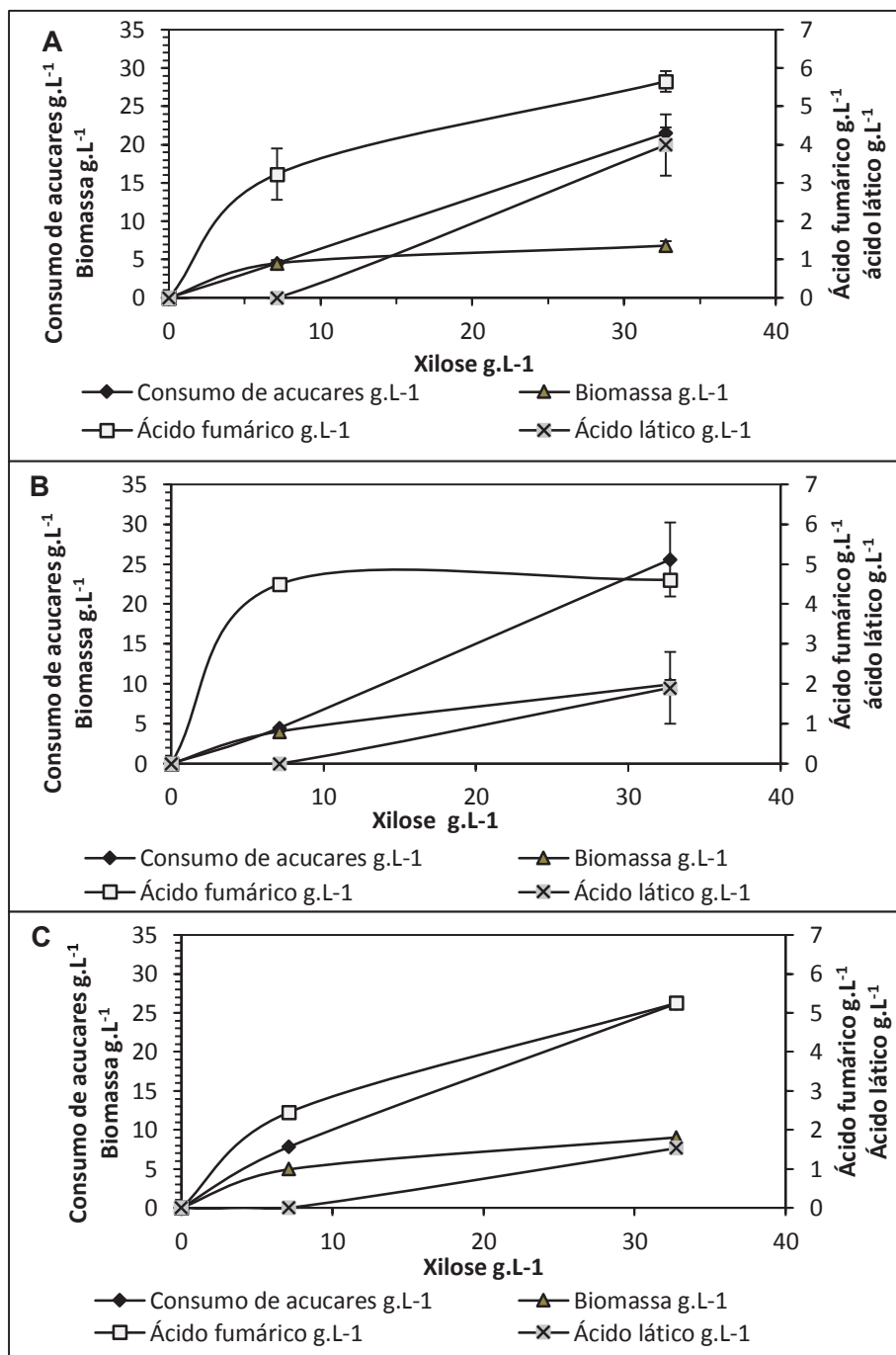


Figura 4-7. Produção de ácidos orgânicos usando peptona de soja. A: *R. circicans* 1475. B: *R.* 395. C: *R.* 3275.

Os fungos *R. circicans* 1475, R. 395 e R. 3271 foram escolhidos pela capacidade de sintetizar ácido fumárico em presença de peptona de soja e sulfato de amônio. Na figura 4-7A, *R. circicans* 1475, eleva sua produção de ácido fumárico de $3,23 \pm 0,67 \text{ g.L}^{-1}$ até $5,65 \pm 0,27 \text{ g.L}^{-1}$ o que representa um incremento de 57,1%, ao aumentar a concentração de açúcares totais de $10,90 \pm 0,28$ até $45,31 \pm 2,09$. Esta produção de ácido fumárico é evidenciada pelo consumo de açúcares de $3,58 \pm 0,91 \text{ g.L}^{-1}$ até $11,18 \pm 0,33 \text{ g.L}^{-1}$ o que representa um incremento em 32% em relação ao consumo inicial. A biomassa incrementou-se de um $4,51 \pm 0,39 \text{ g.L}^{-1}$ até um $6,80 \pm 0,60 \text{ g.L}^{-1}$ o que representa um aumento de 66%. Um fato importante é que o ácido láctico apareceu ao aumentar a concentração de açúcares total, chegando a uma concentração de $3,99 \pm 0,80 \text{ g.L}^{-1}$.

Na figura 4-7B, R. 395 incrementou sua produção de ácido fumárico de $4,50 \text{ g.L}^{-1}$ até $4,61 \text{ g.L}^{-1}$ não apresentando diferença significativa ($p > 0,05$), pelo que pode-se assumir que não teve aumento na produção de ácido fumárico quando se eleva a concentração de açúcares totais de $10,90 \pm 0,28$ até $45,31 \pm 2,09$. Mesmo que a produção de ácido fumárico seja baixo o consumo de açúcares foi maior, indo de $4,49 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}$ até $14,78 \pm 2,15 \text{ g.L}^{-1}$ o que representa um incremento em 30%. A biomassa incrementou-se de um $4,03 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$ até um $9,94 \pm 0,55 \text{ g.L}^{-1}$ o que representa um aumento de 40%. Registrou-se também que em maiores quantidades de açúcares o ácido láctico foi produzido, indo desde 0 g.L^{-1} até $1,90 \pm 0,90 \text{ g.L}^{-1}$, sendo menor a produção que do *R. circicans* 1475.

Na figura 4-7C, R. 3271, incrementou sua produção de ácido fumárico de $2,45 \text{ g.L}^{-1}$ até $5,25 \text{ g.L}^{-1}$ o que representa o um aumento de 46.6%. O consumo de açúcares totais vai de $4,46 \pm 0,52$ até $15,31 \pm 2,09 \text{ g.L}^{-1}$ o que representa um incremento em 29%. A biomassa incrementou-se de um $4,94 \pm 0,86 \text{ g.L}^{-1}$ até um $9,03 \pm 0,61 \text{ g.L}^{-1}$ o que representa um aumento de 55%. Registrou-se também a presença de ácido láctico quando aumenta a concentração de açúcares de 0.0 g.L^{-1} até $1,53 \pm 0,47 \text{ g.L}^{-1}$.

No análise dos parâmetros de medição dos três fungos avaliados, se pode apreciar que R. 3271 foi o fungo que mais açúcares totais consumiu ($15,39 \pm 3,85 \text{ g.L}^{-1}$) o que representa um consumo de 34%. R. 395 foi o fungo na

sequencia, que também apresentou um consumo elevado de açúcares de $14,78 \pm 2,15 \text{ g.L}^{-1}$ o que representa um consumo de açúcares 32.6% e *R. circicans* 1475 foi o fungo com menor consumo de açúcares totais ($11,18 \pm 0,33 \text{ g.L}^{-1}$) o que representa um 24.7% da concentração inicial do meio. O maior consumo de açúcares pode estar vinculado a formação de biomassa e do massa seca dos fungos, por isso existe uma correlação entre o consumo de açúcares e a formação de biomassa, nosso caso os fungos que tiveram maior biomassa foram os que consumiram maior quantidade de açúcares (R. 395 e R. 3271); embora *R. circicans* 1475 tem uma menor formação de biomassa, ele produz maior quantidade ácido fumárico e ácido láctico, tendo os maiores rendimentos em $10,90$ e $45,31 \text{ g.L}^{-1}$ de açúcares. A peptona de soja não só estimula a produção de biomassa senão que prove de cofatores e vitaminas para o desenvolvimento adequado do microrganismo, por este motivo, a utilização de esta fonte nitrogenada deve ser considerada uma boa opção para a produção de ácidos orgânicos.

Os fungos *R. circicans* 1475, R. 395 e R. 3271, apresentaram maiores rendimentos de ácido fumárico em presença de $10,90 \text{ g.L}^{-1}$ de concentração de açúcar no meio, em relação aos $45,31 \text{ g.L}^{-1}$, dos açúcares no outro meio. Estes resultados se explicariam pela quantidade de xilose no meio que poderia causar uma inibição por aumento de substrato, além das limitações metabólicas que tem *Rhizopus* ao metabolizar completamente a xilose, sem esquecer-se do aumento das concentrações dos subprodutos da hidrólise como o HMF e o furfural. R. 395 em $10,90 \text{ g.L}^{-1}$ de açúcares no meio apresentou o melhor rendimento dos três fungos, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$), pelo que pode ser candidato para avaliações em batelada alimentada em experimentos futuros. Quando a concentração de açúcares aumenta, *R. circicans* 1475 e R. 3271, apresentam maiores produções, mas sem ter diferença significativa entre eles ($p > 0,05$), também evidenciou-se que R. 3271 consumiu um 37,65% mais açúcares e produziu um 32,79% mais biomassa que *R. circicans* 1475. Portanto *R. circicans* 1475 com um menor consumo de açúcares, produz menor quantidade de biomassa e similares teores de ácido fumárico que R. 3271.

Na figura 4-8, se apresentam os resultados de produção de ácido fumárico, ácido láctico, consumo de açúcares e produção de biomassa fúngicas usando *R. circicans* 1475 (A), *R. 395* (B) e *R. 3271* (C), no meio hidrolisado da palma com sulfato de amônio. Na figura 4-8A, *R. circicans* 1475, produz ácido fumárico, mas os valores não tem significativa entre eles, indo desde $3,12 \pm 0,30$ até $3,98 \pm 0,62 \text{ g.L}^{-1}$. O consumo de açúcar na fermentação foi de $4,06 \pm 2,00 \text{ g.L}^{-1}$ (açúcar total de $10,90 \pm 0,28 \text{ g.L}^{-1}$) e de $18,48 \pm 0,52 \text{ g.L}^{-1}$ (açúcar total de $45,31 \pm 2,09 \text{ g.L}^{-1}$) o que representa um incremento do consumo 22%. A biomassa incrementou-se de um $3,765 \pm 0,34 \text{ g.L}^{-1}$ até um $8,18 \pm 0,30 \text{ g.L}^{-1}$ o que representa um aumento de 46%. A produção de ácido láctico não teve um incremento significativo entre o grupo de baixa concentração de açúcares e de alta concentração de açúcares. Na figura 4-8B, *R. 395*, produz ácido fumárico, mas não se aprecia um incremento significativo ($p > 0,05$) de sua concentração ao aumentar a concentração de açúcares, estes valores vão de $2,76 \pm 1,02$ até $3,98 \pm 0,62 \text{ g.L}^{-1}$. A concentração de açúcar utilizado na fermentação foi de $5,22 \pm 0,44 \text{ g.L}^{-1}$ (açúcar total de $10,90 \pm 0,28 \text{ g.L}^{-1}$) e de $18,75 \pm 2,63 \text{ g.L}^{-1}$ (açúcar total de $45,31 \pm 2,09 \text{ g.L}^{-1}$) o que representa um incremento do consumo 28% em relação a condição inicial. A biomassa incrementou-se de um $3,98 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$ até um $9,05 \pm 1,73 \text{ g.L}^{-1}$ o que representa um aumento de 44%. A produção de ácido láctico foi maior quando a concentração de açúcares foi menor apresentando um valor de $3,00 \pm 1,64 \text{ g.L}^{-1}$, mas quando elevou-se a concentração de açúcar no meio o valor diminuiu até $1,09 \pm 0,02$.

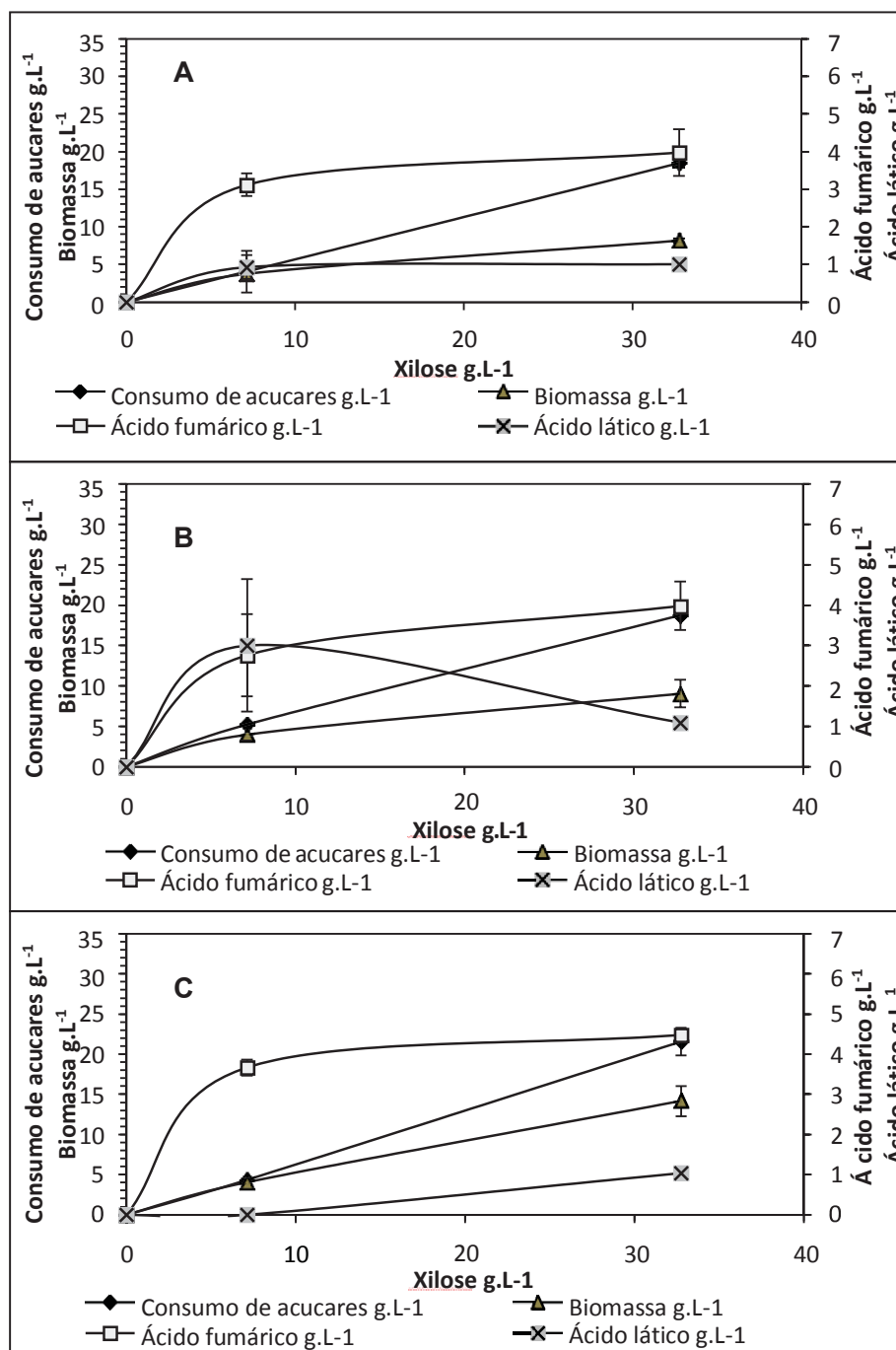


Figura 4-8. Produção de ácidos orgânicos usando sulfato de amônia. A: *R. circicans* 1475. B: *R. 395*. C: *R. 3275*.

Na figura 4-8C, *R. 395*, produz ácido fumárico, existindo um incremento significativo ($p < 0.05$) de sua concentração ao aumentar a concentração de açúcares, estes valores vão de $3,67 \pm 0,20$ até $4,48 \pm 0,15$ g.L⁻¹. O consumo de açúcar na fermentação foi de $4,36 \pm 0,14$ g.L⁻¹ (açúcar total de $10,90 \pm 0,28$ g.L⁻¹) e de $21,59 \pm 1,72$ g.L⁻¹ (açúcar total de $45,31 \pm 2,09$ g.L⁻¹) o que representa um incremento do consumo 20% em relação a condição inicial. A biomassa incrementou-se de um $4,05 \pm 0,25$ g.L⁻¹ até um $14,18 \pm 1,87$ g.L⁻¹ o que representa um aumento de 28,5%. A produção de ácido láctico foi detectada quando a concentração de açúcares foi mais elevada $1,04 \pm 0,01$ g.L⁻¹.

No análise dos parâmetros de medição dos três fungos avaliados, se pode apreciar que *R. 3271* foi o fungo que mais açúcares totais consumiu ($21,59 \pm 3,85$ g.L⁻¹) o que representa um consumo de 47,6%. *R. 395* e *R. circicans 1475* tiveram consumos similares como 41% 40,7% respectivamente. Ao igual que na figura anterior, *R. 3271*, apresentou maior quantidade de biomassa, em relação aos outros fungos avaliados. Quando se analisa a produção de ácido fumárico, se observa que não existe diferença significativa entre os fungos *R. circicans 1475* e *R. 395*, mas *R. 3271* apresenta a maior concentração. O ácido láctico apresentou valores baixos em geral, mas *R. 395* com uma concentração de açúcares baixa no meio conseguiu obter $3,00 \pm 1,64$ que ressalta dos outros resultados e poderia indicar que existe uma inibição por aumento de substrato.

Os valores da produção de ácido fumárico em concentrações de $10,90$ g.L⁻¹ e $45,31$ g.L⁻¹ de açúcares no meio cada um, não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$). Alias, determinou-se que *R. 395* sintetiza ácido láctico em concentrações de $10,90$ g.L⁻¹ de açúcar no meio.

4.2. Conclusões.

- ✓ Determinou-se que as 17 cepas de *Rhizopus* produziram ácido fumárico, usando os açúcares contidos no hidrolisado dos cachos vazios dapalma.
- ✓ Determinou-se que o R. 395 em concentrações de açúcares de 10,90 g.L⁻¹ com 6,0 g.L⁻¹ de peptona de soja, produziu 4,50 g.L⁻¹ de ácidofumárico.
- ✓ Determinou-se que *R. circicans* 1475 e R. 3271 em concentrações de açúcar de 45,31 g.L⁻¹, produziram 5,65 g.L⁻¹ e 5,25 g.L⁻¹ de ácido fumárico respectivamente.
- ✓ Determinou-se que existe biossínteses de outro ácido. *R. circicans* 1475 em presença de 45,31 g.L⁻¹ de açúcares e 6,0 peptona de soja, produziu 3,99 g.L⁻¹ de ácido láctico.
- ✓ Determinou-se que o pellet e as formas miceliares dispersas favorecem a produção de ácido fumárico.

4.5. Referências.

Abe, A., Oda, Y., Asano, K., & Sone, T. *Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers. *Mycologia*, 99(5), 714-722, 2007.

AL-TURKI, A. I., et al. Microbial polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in soil. *Res J Environ Toxicol*, vol. 3, p. 1-8, 2009.

BUTKEWITSCH, V. S.; FEDEROFF, M. tJber Bildung von Fumarsaure in den Zuckerkulturen von Mucorstolonifer (*Rhizopus nigricans*) und sein Verhalten zur Brenztraubsaure. *Biochem. Z*, vol. 206, p. 440-456, 1929.

GUIRAUD, P., et al. Metabolism of vanillic acid by micromycetes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 8, no 3, p. 270-275, 1992.

LIU, Yan, et al. Optimization of L-(+)-lactic acid production using pelletized filamentous *Rhizopus oryzae* NRRL 395. En *Twenty-Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press, p. 844-853, 2006

FOSTER, J. W.; WAKSMAN, S. A. The Production of Fumaric Acid by Molds Belonging to the Genus *Rhizopus*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 61, n. 1, p. 127–135, 1939.

HADI, T. A.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Optimization of tannase biosynthesis by a newly isolated *Rhizopus oryzae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 11, no 6, p. 239-243, 1994.

KRIVOBOK, S., et al. Biodegradation of anthracene by soil fungi. *Chemosphere*, vol. 37, no 3, p. 523-530, 1998

MADIGAN, Michael T., et al. Brock Biology of microorganisms 12th edn. *Int. Microbiol*, vol. 11, p. 65-73, 2008

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.

PEREIRA, R., et al. The effectiveness of a biological treatment with *Rhizopus oryzae* and of a photo-Fenton oxidation in the mitigation of toxicity of a bleached kraft pulp mill effluent. *Water research*, vol. 43, no 9, p. 2471-2480, 2009

PUROHIT, Jogeswar Satchidananda, et al. Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, vol. 97, no 6, p. 795-801, 2006

ROA ENGEL, C. A.; STRAATHOF, A. J. J.; ZIJLMANS, T. W.; VAN GULIK, W. M.; VAN DER WIELEN, L. A. M. Fumaric acid production by fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 3, p. 379–389, 2008.

TAKAHASHI, T., e ASAI, T., "Acids Formed by Species of *Rhizopus*," Proc. Imp. Acad. Sci., Japan, 3, 86-89, 1927.

TOKIWA, Yutaka; SUZUKI, Tomoo; TAKEDA, Kiyoshi. Two types of lipases in hydrolysis of polyester. *Agricultural and biological chemistry*, vol. 52, no 8, p. 1937-1943, 1988

WANG, G.; HUANG, D.; LI, Y.; WEN, J.; JIA, X. A metabolic-based approach to improve xylose utilization for fumaric acid production from acid pretreated wheat bran by *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 119–127, 2015.

ZHOU, Z.; DU, G.; HUA, Z.; ZHOU, J.; CHEN, J. Optimization of fumaric acid production by *Rhizopus delemar* based on the morphology formation. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9345–9349, 2011.

ANEXO

Analise estadístico de ANOVA.

Foram testadas 17 cepas de *Rhizopus* usando ANOVA para ver o analise de variância entre grupos e dentro dos grupos. Os resultados são apresentados na sequencia.

Analise de variância de um fator com todos os grupos.

RESUMO

Grupos	Conta	Suma	Meia	variância
R. 395	2	4.9634	2.4817	10.9503
<i>R. circicans</i> 1475	2	4.4970	2.2485	9.1188
R. 3271	2	3.9296	1.9648	0.3695
<i>R. delemar</i> 34612	2	2.9700	1.4850	0.0841
<i>R. oligosporium</i> 3267	2	2.8300	1.4150	0.1895
R. 5905	2	2.3500	1.1750	0.0221
<i>R. oryzae</i> 28168	2	1.8750	0.9375	1.5313
<i>R. oryzae</i> 28627	2	0.8643	0.4321	0.0404
<i>R. arrhizus</i> 2582	2	0.5200	0.2600	0.0008
<i>R. delemar</i> 1492	2	0.4900	0.2450	0.0041
<i>R. arrhizus</i> 16179	2	0.4328	0.2164	0.0178
<i>R. 28169</i>	2	0.4444	0.2222	0.0022
<i>R. oligosporium</i> 25975	2	0.3400	0.1700	0.0018
<i>R. formosa</i> 28422	2	0.1780	0.0890	0.0000
R. 3562	2	0.5200	0.2600	0.0288

ANÁLISE DE Variância

Origem das variacoes	Soma de quadrados	Grados de libertade	Meia das quadrados	F	Probabilid ade	Valor crítico para F
Entre grupos	19.44435862	14	1.388882759	0.9316	0.5502	2.42436
Dentro dos grupos	22.36120174	15	1.490746783			
Total	41.80556036	29				

Foram testadas 12 cepas de *Rhizopus* usando anova para ver o analise de variância entre grupos e dentro dos grupos. Os resultados são apresentados na sequencia.

Análisis de varianza de un factor sin tres grupos que tienen mucha varianza

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Meia</i>	<i>variância</i>
R. 3271	2	3.9296	1.9648	0.3695
<i>R. delemar</i> 34612	2	2.9700	1.4850	0.0841
<i>R. oligosporium</i> 3267	2	2.8300	1.4150	0.1895
R. 5905	2	2.3500	1.1750	0.0221
<i>R. oryzae</i> 28627	2	0.8643	0.4321	0.0404
<i>R. arrhizus</i> 2582	2	0.5200	0.2600	0.0008
<i>R. delemar</i> 1492	2	0.4900	0.2450	0.0041
<i>R. arrhizus</i> 16179	2	0.4328	0.2164	0.0178
R. 28169	2	0.4444	0.2222	0.0022
<i>R. oligosporium</i> 25975	2	0.3400	0.1700	0.0018
<i>R. formosa</i> 28422	2	0.1780	0.0890	0.0000
R. 3562	2	0.5200	0.2600	0.0288

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Soma de cuadrados</i>	<i>grãos de libertade</i>	<i>Meia dos quadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidade</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	9.43416625	11	0.85765148	13.52594	0.00004	2.71733
Dentro dos grupos	0.76089465	12	0.06340789			
Total	10.1950609	23				

Teste de Tukey

Variáveis de mediação para Teste de Tukey

HSD	<u>0.40852377</u>
Q α	<u>5.62</u>
Mse	<u>0.06340789</u>
n	<u>12</u>

HSD: Diferença honestamente significativa

Q α : Multiplicador

MSe: Cuadrado do erro meio

N: Tamanho de cada um dos grupos

Tabela 4-7. Valores relacionados das meias de cada Rhizopus com o valor De HSD.

	R. 3271	<i>R. delemar</i> 34612	<i>R. oligosporium</i> 3267	R. 5905	<i>R. oryzae</i> 28627	<i>R. arrhizus</i> 2582	<i>R. delemar</i> 1492	<i>R. arrhizus</i> 16179	R. 28169	<i>R. oligosporium</i> 25975	<i>R. formosa</i> 28422	R. 3562
R. 3271		0.48	0.55	0.79	1.53	1.70	1.72	1.75	1.74	1.79	1.88	1.70
<i>R. delemar</i> 34612	0.48		0.07	0.31	1.05	1.23	1.24	1.27	1.26	1.32	1.40	1.23
<i>R. oligosporium</i> 3267	0.55	-0.07		1.18	0.98	1.15	1.17	1.20	1.19	1.24	1.33	1.15
R. 5905	0.79	-0.31	-0.24		0.74	0.92	0.93	0.96	0.95	1.01	1.09	0.92
<i>R. oryzae</i> 28627						0.17	0.19	0.22	0.21	0.26	0.34	0.17
<i>R. arrhizus</i> 2582							0.02	0.04	0.04	0.09	0.17	0.00
<i>R. delemar</i> 1492								0.03	0.02	0.08	0.16	-0.02
<i>R. arrhizus</i> 16179									0.05	0.05	0.13	-0.04
R. 28169										0.05	0.13	-0.04
<i>R. oligosporium</i> 25975											0.08	-0.09
<i>R. formosa</i> 28422												-0.17
R. 3562												

Onde as casas de cor amarela, indicam que existe diferença significativa dos Rhizopus 3271, *R. delemar* 34612, *R. oligosporium* 3267 e R. 5905. Mas o valor da media da produção de ácido fumárico de R. 3271 é significativamente diferente a todos os fungos testados. As casas de cor laranja sinalizam que não existe estatisticamente diferença significativa entre as meias dos Rhizopus avaliados

Na figura 4-9, são mostradas as morfologias das biomassas produzidas no final da fermentação, usando peptona de soja. As características dos fungos avaliados é que formaram só pellet (*R. 395*), micélio e pellet (*R. circicans* 1475), pellet em racimo (*R. 3271* e *R. delemar* 34612), só micélio (*R. oryzae* 28168) e grumo e micélio (*R. oligosporium* 3267).

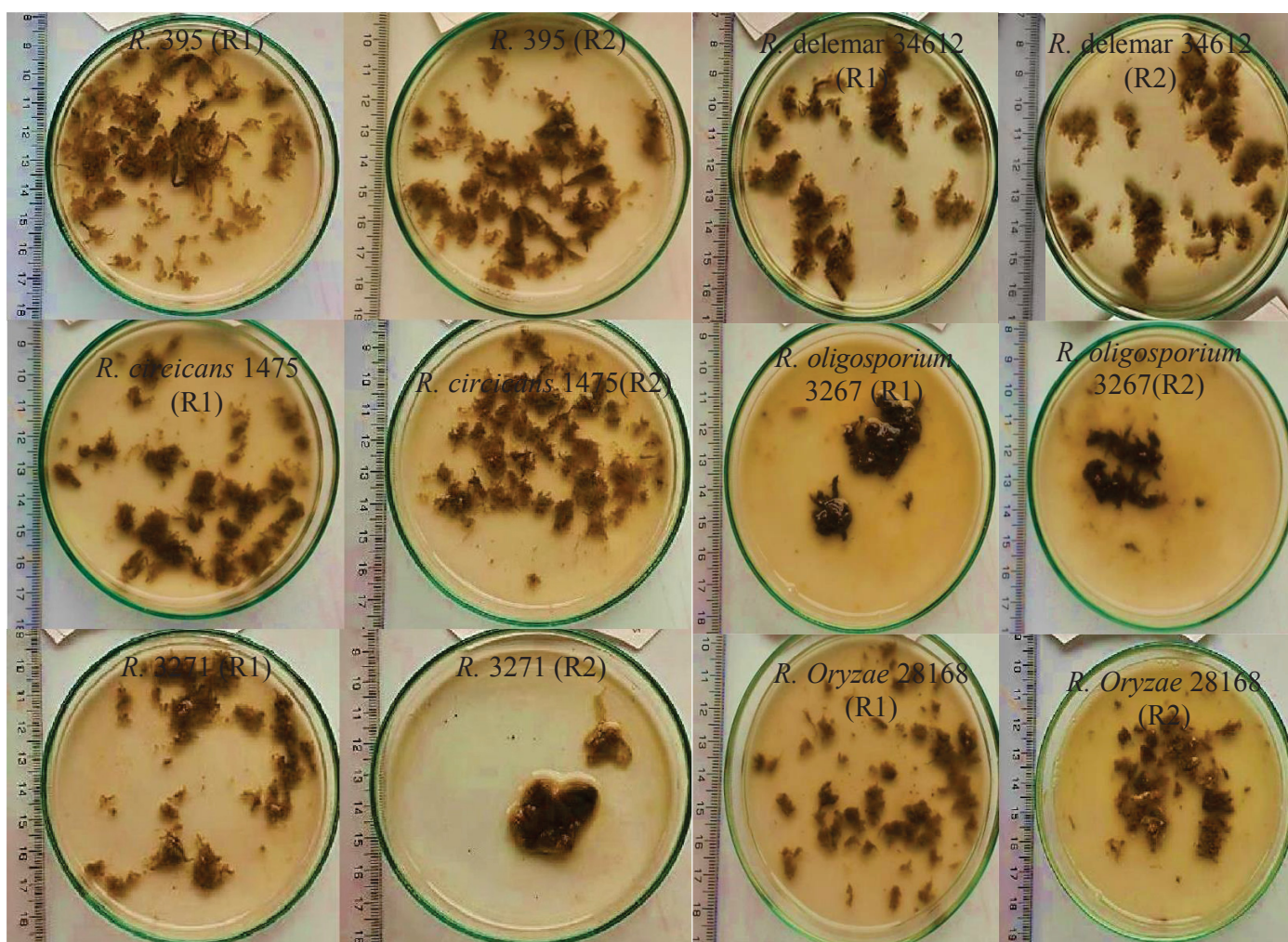


Figura 4-9. Morfologias da biomassa dos seis fungos avaliados na primeira seleção usando peptona de soja.

Na figura 4-10, se apresentam as morfologias das biomassas produzidas no final da fermentação, usando sulfato de amônia. As características dos fungos avaliados é que formaram grumo (*R. 395*), pellet escassos (*R. circicans* 1475; *R. delemar* 34612; *R. oligosporium* 3267), micélio (*R. 3271*; *R. delemar* 3612; *R. oligosporium* 3267; *R. oryzae* 28168).

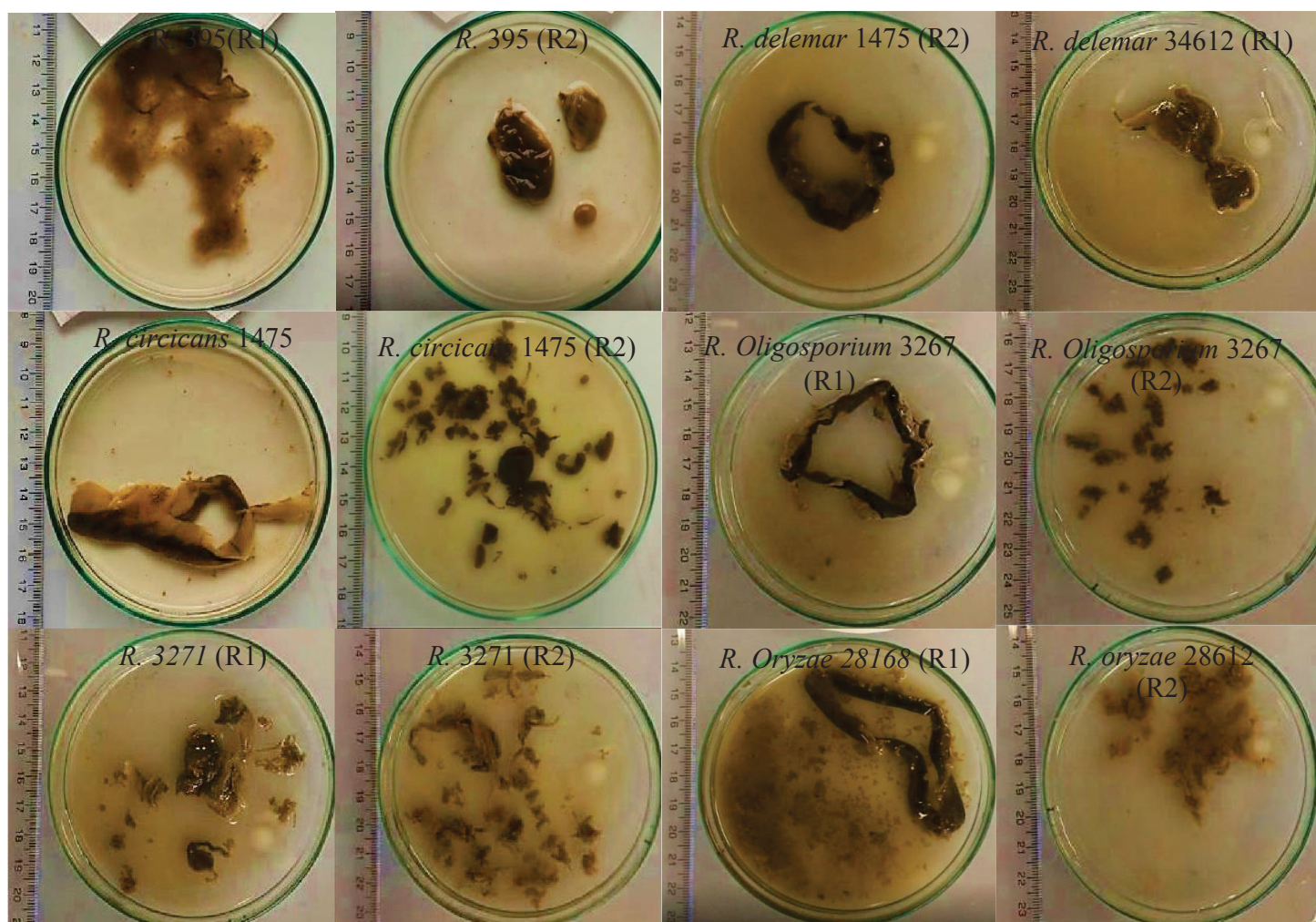


Figura 4-10. Morfologias da biomassa dos seis fungos avaliados na primeira seleção usando sulfato de amônio.

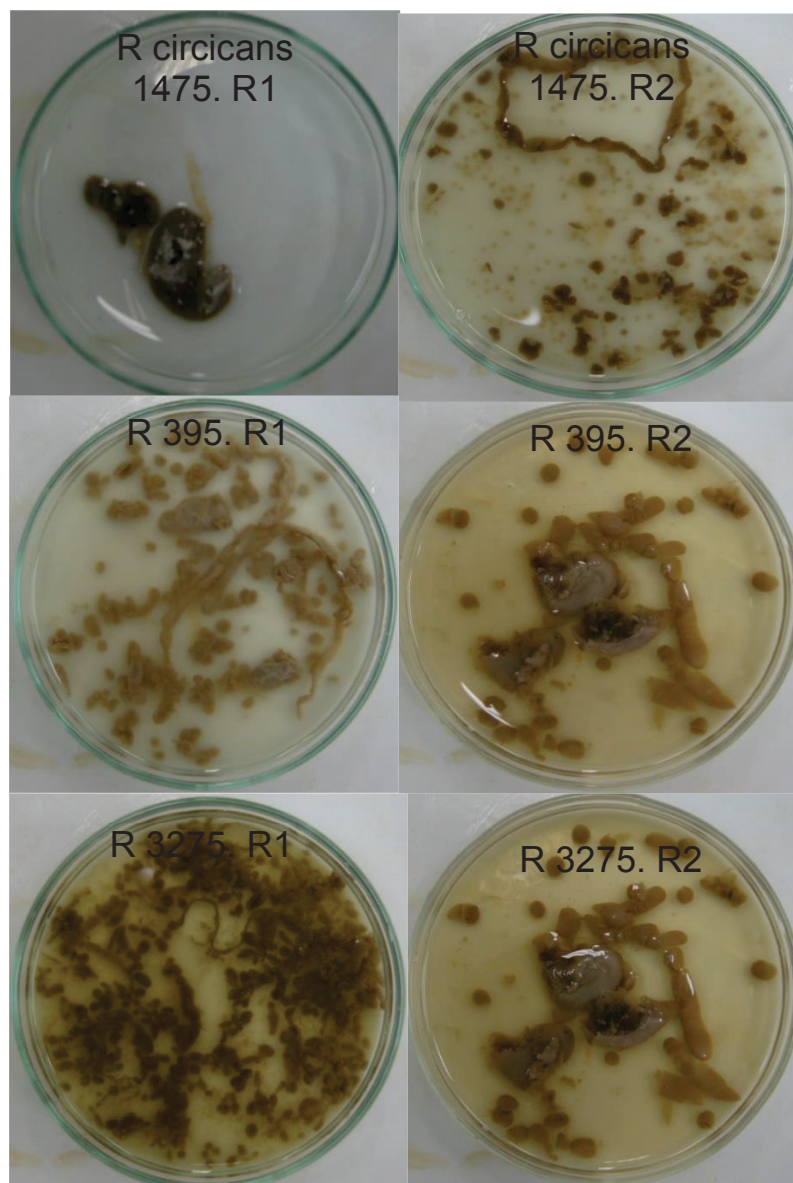


Figura 4-11. Morfologias da biomassa dos três fungos avaliados na segunda seleção usando peptona de soja.

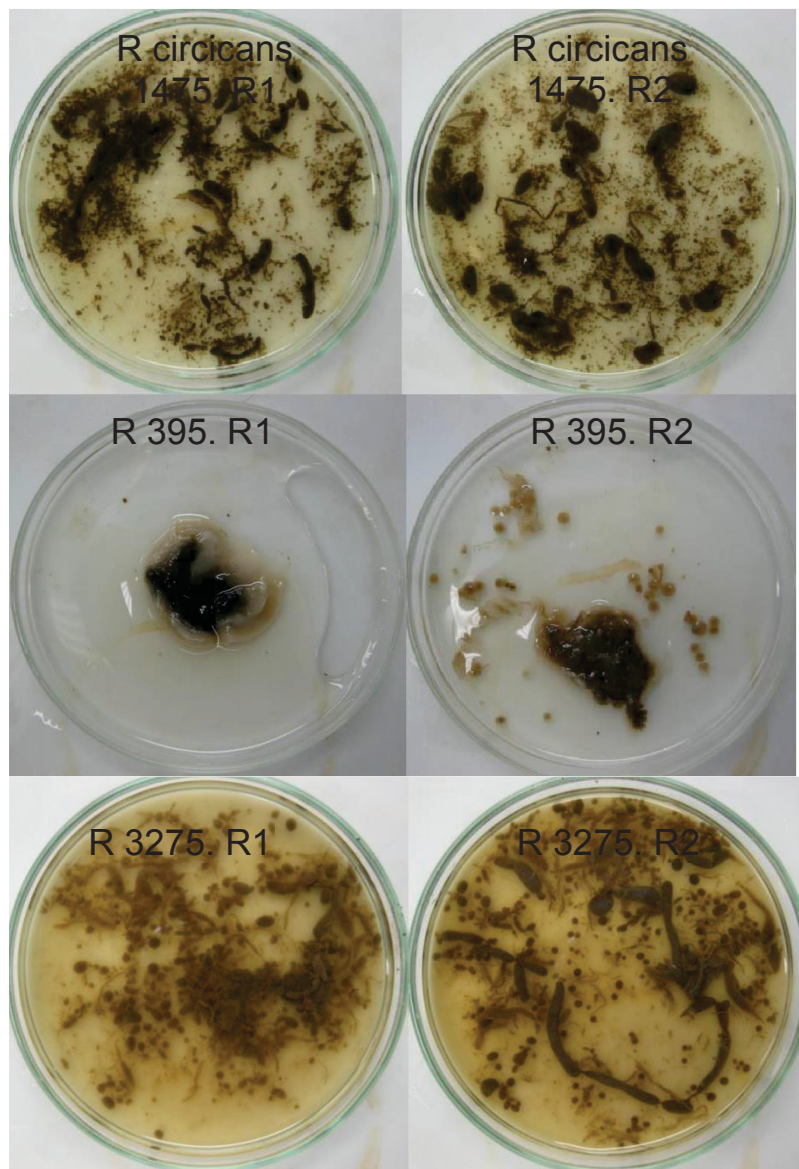


Figura 4-12. Morfologias da biomassa dos três fungos avaliados na segunda seleção usando sulfato de amônio.

Tabela 4-6. Parâmetros de medição das fermentações por *Rhizopus* no hidrolisado dos cachos vazios do fruto da palma, usando peptona de soja.

Parâmetros de medição	Fungos					
	<i>R. circicans</i> 1475		R. 395		R. 3271	
Concentração de açúcares g.L ⁻¹	10,90±0,28	45,31±2,09	10,90±0,28	45,31±2,09	10,90±0,28	45,31±2,09
Açúcar consumido g.L ⁻¹	3,58±0,91	11,18±0,33	4,49±0,05	14,78±2,15	4,46±0,52	15,39±3,85
Biomassa g.L ⁻¹	4,51±0,39	6,80±0,60	4,03±0,03	9,94±0,55	4,94±0,86	9,03±0,61
Ácido fumárico g.L ⁻¹	3,23±0,67	5,65±0,27	4,50±0,04	4,61±0,14	2,45±0,20	5,25±0,82
Ácido láctico g.L ⁻¹	0,00±0,00	3,99±0,80	0,00±0,00	1,90±0,90	0,00±0,00	1,53±0,47
Y (AF)	0,90	0,48	1,01	0,31	0,55	0,34
Y (AL)	0,00	0,36	0,00	0,13	0	0,10
Y (AO)	0,90	0,86	4,50	0,44	0	0,44

Tabela 4-9. Parâmetros de medição das fermentações por *Rhizopus*, usando sulfato de amônio.

Parâmetros de medição	Fungos					
	<i>R. circicans</i> 1475		R. 395		R. 3271	
Concentração de açúcares g.L ⁻¹	10,90±0,28	45,31±2,09	10,90±0,28	45,31±2,09	10,90±0,28	45,31±2,09
Açúcar consumido g.L ⁻¹	4,06±2,77	18,48±0,52	5,22±0,44	18,75±2,63	4,36±0,14	21,59±1,72
Biomassa g.L ⁻¹	3,765±0,34	8,18±0,30	3,98±0,04	9,05±1,73	4,05±0,25	14,18±1,87
Ácido fumárico g.L ⁻¹	3,12±0,30	3,98±0,62	2,76±1,02	3,98±0,60	3,67±0,20	4,48±0,15
Ácido láctico g.L ⁻¹	0,93±0,32	1,01±0,04	3,00±1,64	1,09±0,02	0,00±0,00	1,04±0,01
Y (AF)	0,77	0,05	0,53	0,21	0,84	0,21
Y (AL)	0,23	0,05	0,57	0,06	0	0,05
Y (AO)	1,00	0,27	1,10	0,27	0,84	0,26